



TITLE:

フザリウムに関与する植物の交叉  
病害抵抗性に関する研究(  
Dissertation\_全文)

AUTHOR(S):

清水, 文一

---

CITATION:

清水, 文一. フザリウムに関与する植物の交叉病害抵抗性に関する研究.  
京都大学, 2000, 博士(農学)

ISSUE DATE:

2000-07-24

URL:

<https://doi.org/10.11501/3172800>

RIGHT:

②

# フザリウムに関与する植物の交叉病害抵抗性に関する研究

清 水 文 一

2000

## 目 次

	頁
緒言	1
第1章 サツマイモのファイトアレキシシン ipomeamarone と 非病原性 <i>Fusarium</i> によって誘導される抵抗性	5
1-1 緒論	5
1-2 材料および方法	6
1-3 結果	10
1-4 考察	12
1-5 合成の部	13
第2章 非病原性 <i>Fusarium</i> によって誘導される 交叉抵抗性の簡便なモデル系の確立	21
2-1 緒論	21
2-2 材料および方法	22
2-3 結果	24
2-4 考察	31
第3章 非病原性 <i>Fusarium</i> によって誘導される ソライロアサガオの交叉抵抗性	34
3-1 緒論	34
3-2 材料および方法	35
3-3 結果	37
3-4 考察	39
第4章 交叉抵抗性の発現にともなう植物の二次代謝変化	41
4-1 緒論	41
4-2 材料および方法	42
4-3 結果	46
4-4 考察	58

第5章 サツマイモつる割れ病菌の産生する植物毒素	62
5-1 緒論	62
5-2 材料および方法	62
5-3 結果	65
5-4 考察	69
第6章 総括	71
本研究に関する原著論文など	73
参考文献	74
付録	
謝辞	

## 緒言

農業の歴史は病害との戦いの歴史でもあった。江戸時代の日本の三大飢饉といわれる1732年の享保大飢饉はウンカの大発生によって、1782年天明大飢饉、1833年の天保大飢饉は冷害、そしてイモチ病による稲の大凶作が原因で生じたものである。これら幾度にもわたる飢饉は、当時の農業が病虫害に対して無力で、安定した収穫をもたらすことができなかったことを示している。飢饉の歴史の中で成立してきた日本各地の祭りは、虫送りなどに見られるように農作物の豊作や病虫害が無くなり収穫が安定して欲しいという人々の祈りの現れであるといえる。そして人々は安定した収穫を得るため、ただ願うだけでなく植物を守る様々な方法を編み出してきた。江戸初期に考案されたとされる、田圃に鯨油をまき稲についたウンカを油膜に払い落とすことで溺死させて防除するという方法は単純ながら、第二次世界大戦後のBHC粉剤による防除法が登場するまでの長期にわたって用いられた。また薬剤を用いた方法として、タバコの煎汁やトリカブト、樟脳などを用いた害虫駆除法も考案された。ヨーロッパでは硫酸銅水溶液と石灰水溶液からなるボルドー液によるブドウの病害の防除が考案されている。これら初期の薬剤につづいて近年、天然に存在する活性物質などをもとにつくられた数々の合成農薬が世に登場し、農作物の収量安定と増加に貢献し、現在の人口を養っている。これらの薬剤によってもたらされる効果的な植物防疫によって我々人類はその人口を増やしてきたと言っても過言ではないのである。

しかし薬剤による病虫害の防除法は万能ではなかった。土地の高度利用を目的とした強度の連作や単一の作物の連作は土壌微生物相に変化きたし、作付け作物に有害な微生物にとって有利な条件を作り上げてしまう。このようにして発生する病害を土壌病害（土壌伝染性病害）と呼ぶ。土壌の物理性は複雑で薬剤の散布による防除は十分に効果を発揮しないことが多い。また多くの病原体は土壌中で耐久体を形成し越年するなどしているため、防除はさらに困難なものとなっている。このような薬剤によって効果的な防除ができない土壌病害の防除に際して、病原体を直接の標的するのではなく、植物が本来有している抵抗性を植物防除に利用する方法が



注目されるようになった。植物の抵抗性は、古くは抵抗性品種を植えることで利用されてきた。しかし近年注目を浴びているのは、植物が本来持っている抵抗性を積極的に活性化することにより効果を得る防除法である。2,6-Dichloroisonicotinic acid (Delaney et al., 1995; Schweizer et al., 1997) や benzo-(1,2,3)-thiadiazole-7-carbothioic acid S-methyl ester (Kessmann et al., 1994; Görlach et al., 1996; Benhamou and Bélanger, 1998) はこのような抵抗性を活性化する薬剤として実用化されている。また薬剤ではなく、土壌や植物体から単離した非病原性もしくは弱毒性レースを植物に処理することによっても植物が抵抗性を獲得する例が知られている (Gessler and Kuć, 1982; Doubrava et al., 1988; Rausher et al., 1993; Simms and Vision, 1995; Pieterse et al., 1996; Hoffland et al., 1996)。このような微生物を実際の病害防除に用いる方法も試みられている (Weller, 1988) (Honda, 1997) (Honda, 1997) (山田 他, 1997)。そのなかでも、非病原性フザリウムを用いたサツマイモつる割れ病の防除法は圃場で高い効果を発揮し、現在実用化されている数少ない例の一つである (Ogawa and Komada, 1984) (Ogawa, 1988)。

サツマイモ (*Ipomoea batatas* L.) は中南米が原産といわれ、日本には江戸時代に琉球王国経由でもたらされたと言われる。当時、琉球王国の窓口であった薩摩藩がその名前の由来となった。サツマイモは鹿児島地方のシラス台地に代表されるやせた土壌でも栽培することができ、また比較的収穫が天候に左右されることが少ないため「救荒作物」として広く栽培され、わが国の食糧難を救ってきた。サツマイモは比較的病害に強いこともあり、栽培が容易である。しかし病気に弱い品種がいくつか知られている。高系 14 号と紅赤を交配して作出された新品種ベニコマチはイモの色および味ともに優れているが、サツマイモつる割れ病に対して高い感受性を示す。圃場で株ごと枯死してしまう本病害のために、優れた品種にも関わらずいまだに本品種の作付け率は低いものとなっている。

サツマイモつる割れ病は *Fusarium oxysporum* f. sp. *batatas* (pathogenic *Fusarium* ; PF) によって引き起こされる土壌病害の一つで、罹病した株は茎部に激しい縦裂を生ずるためこの名がある。感染初期に葉の黄化や萎凋症状があらわれ、症状が進むと茎部が縦裂し枯死にいたり、大きな減収を伴うため、本病害発生圃場では深刻な

問題となっている。しかしながらサツマイモ導管内から単離された非病原性 *F. oxysporum* (non-pathogenic *Fusarium* ; NPF) を用いる防除法はサツマイモつる割れ病に対して高い防除効果を示し、現在では NPF 菌体が製剤化され実用化されている (Ogawa and Komada, 1984; Ogawa, 1988)。この防除法はサツマイモの作付け時に苗の切り口基部をその孢子懸濁液で処理することによって行われる。この前処理をしておくことによりその後の圃場での発病が大きく低減する。また同様の非病原性 *Fusarium* を用いる生物防除はハウレンソウ (Katsube and Akasaka, 1997)、トマト (Watanabe et al., 1991)、カーネーション (Baker et al., 1978) やキウリ (Gessler and Kuć, 1982) においてもその有効性が示されている。いずれの場合においても NPF と PF 間に拮抗作用は観察されておらず、これらの現象は菌同士の直接の相互作用によるものではなく、NPF の前処理が植物に作用して抵抗性を誘導することによってもたらされると考えられている。しかし NPF の有する抵抗性誘導因子とその誘導機作および抵抗性の実体に関しては不明な点が多い。

現在、薬剤の使用に偏った防除法の与える環境への負荷が問題視される中、「総合防除」という考えが叫ばれるようになった。これはそれぞれの作物について病原だけでなく、環境要因や病気の発生形態、地域性、有効な薬剤などのあらゆる情報をふまえた上で、できる限り環境への負荷を減らし、効果的に病害を防除しようという考え方である。したがって本現象における菌-植物間の相互作用の理解とそのメカニズムの応用は、これからの植物防疫にとって大変有用であると考えられる。そこで本研究では NPF によるサツマイモ病害抵抗性誘導に関与する化学因子の解明を目指した。まず第 1 章ではサツマイモのファイトアレキシンとして知られる ipomeamarone の誘導抵抗性との関連について検討を行った。また本現象を解析する上で、サツマイモ幼苗は均一な試料を得にくく取り扱いが困難であったことから、サツマイモと近縁種にあるソライロアサガオ (*Ipomoea tricolor*) を用いるより簡便な相互作用の評価系の確立を第 2 章で行った。得られた検定系においてこれまでに抵抗性を植物に付与することが知られている薬剤および NPF 培養物による抵抗性誘導に関しての検討を行い、抵抗性誘導のメカニズムに関して検討を加えた (第 3 章)。さらにこの系を用いて、PF の産生する病徴発現に関わる植物毒素の探索 (第

5章) および NPF 処理後の植物組織内の二次代謝変動の検討 (第4章) を行った.

## 1. サツマイモのファイトアレキシシン ipomeamarone と

非病原性 *Fusarium* によって誘導される抵抗性

### 1-1 緒論

植物は病原の侵入に対して物理的, 化学的そして生理学的反応をもって抵抗する防御機構を備えている. 化学的な防御機構の一つに抗菌物質の蓄積が挙げられる. このように植物体に通常は存在しないか, その含量が低く, 病原の侵入にともなって蓄積する抗菌性物質をファイトアレキシシンと呼ぶ (Bailey and Mansfield, 1982).

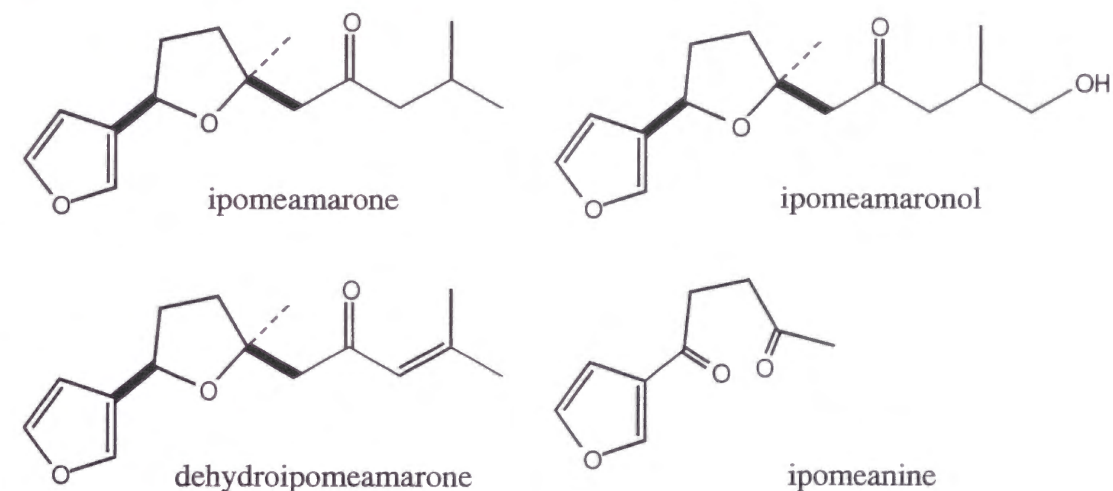


Figure 1-1 ipomeamarone とその関連物質

サツマイモのファイトアレキシシンとして知られる ipomeamarone (Figure 1-1) は, 1943 年わが国で黒斑病菌 *Ceratocystis fimbriata* に侵されたサツマイモ根塊に含まれる苦味物質として報告され (樋浦, 1943), さらにサツマイモ根塊組織内に含まれる ipomeamarone 関係代謝産物と思われる成分の構造もいくつか明らかにされている. その後, これら成分の植物病理学的意義が追求された. とくに黒斑病菌とサツマイモの抵抗性との関係において多くの研究がなされている (Imaseki and Uritani,



1964; Oba et al., 1982; Uritani et al., 1960; Hyodo et al., 1969). その結果, 抵抗性品種ほどその産生能が高い (Kojima and Uritani, 1976) という関係が見出されており, サツマイモの黒斑病菌に対する抵抗性において ipomeamarone が重要な役割を果たしていることが示唆されている. また, ipomeamarone は重金属などの化学的ストレスによっても誘導されること (Uritani et al., 1960; Oba et al., 1982), 抗菌活性は病原に依存すること (Nonaka and Yasui, 1973), 接種菌によって誘導量が異なること (Clark et al., 1981) が報告されている. これまでの研究はサツマイモ根塊組織に関する報告が多く, 地上部での ipomeamarone の挙動を扱ったものはほとんどない.

サツマイモと NPF の相互作用によりサツマイモ地上部に PF に対して高い防除効果が得られる (Ogawa and Komada, 1984). NPF 処理後の茎部抽出物中に PF 孢子発芽抑制効果が見出されていることから, 本抵抗性に何らかの抗菌性物質が関与していることが示唆されている (Ogawa, 1988).

一方, NPF によってサツマイモ苗に誘導される抵抗性における ipomeamarone の役割は不明である. 本章では ipomeamarone が実際に誘導された抵抗性に重要な役割を果たしているのかを検討するため, NPF 処理後のサツマイモ地上部および地下部組織に誘導される ipomeamarone 量の測定を行った. さらに, PF 孢子に対する ipomeamarone の発芽抑制試験を行った.

## 1-2 材料および方法

### 1-2-1 実験材料

#### 植物材料

1998 年 8 月に茨城県農業総合センター圃場ビニールハウス内にて栽培したサツマイモ”ベニコマチ” (*Ipomoea batatas* L. cv. benikomachi) の苗を渡邊健氏より供与いただいた. この苗をカミソリを用いて採取し, 4-7 葉苗をサツマイモ地上部として試験に供試した. また 1997 年 10 月に奈良県生駒市にて収穫したサツマイモ”ベ

ニコマチ”根塊を 15℃で保存したものを地下部試料として用いた.

#### 菌体試料

非病原性フザリウム保存菌体は平板ジャガイモ-しょ糖-寒天 (PSA) 培地にて保存した. この保存菌株, 非病原性フザリウム (*Fusarium oxysporum* 101-2: NPF) もしくはサツマイモつる割れ病菌 (*F. oxysporum* f.sp. *batatas* O-17: PF) をそれぞれジャガイモ-しょ糖液体培地 100 ml に接種し 7 日間 28℃, 100 rpm で振盪培養した. これをガーゼ 1 枚でろ過し, 50 ml 容プラスチック遠心チューブにとり 3,000×G, 10 分間遠心し菌体を集めたのち, 滅菌水にて懸濁し目的の孢子密度に調整し菌体処理液として用いた.

#### 塩化銅処理液 (エリシター処理液)

塩化銅 (II) を滅菌水に溶解し 500 mM に調製したものを適宜滅菌水で希釈することにより処理液を得た.

#### Ipomeamarone 標品

分析に用いた ipomeamarone 標品は, 3-furoic acid を出発原料として合成し逆相高速液体クロマトグラフィーを用いて精製して得られたラセミ混合物を用いた. 合成方法については 1-5 にて述べる.

### 1-2-2 実験方法

#### 地上部

サツマイモ苗の切り口基部を NPF 処理液 ( $10^8$  個 bud-cell/ml), PF 処理液 ( $10^5$  個 bud-cell/ml) および塩化銅処理液 25 mM, そして対照として滅菌水にそれぞれ 500 ml に浸漬し, 24℃に設定したガラス温室内で 20 時間保持した. これらを滅菌水, PF 処理液および塩化銅水溶液にそれぞれ移植, もしくはそのまま保持し同様の条件でさらに 1-3 日間保持した. 各々の実験は各処理区に 3 本の苗を用い, これを 3

回繰り返した。

それぞれの処理苗切り口基部より 3 cm までの茎部をカミソリで採取し、厚さ 3-5 mm に輪切りにしてアセトン 5 ml に 2 日間浸漬抽出した。得られたアセトン抽出液 3 ml を 15 ml 容試験管にとり窒素気流によりアセトンを留去した後、残渣をエチルエーテル 1 ml にて 3 回抽出した。抽出に要した酢酸エチルを窒素気流で除き、残渣に酢酸エチル 0.5 ml を加え分析試料とした。

#### 地下部

サツマイモ根塊を約 4 cm の厚さで輪切りにしたのち、切断面に対して直角にコルクボーラを打ち込み直径 12 mm の筒状の組織片を得た。これをカミソリにて厚さ 5 mm に輪切りにし根塊ディスクを得た。これらを湿室内、暗条件下、25 °C で 1 時間放置した。これに NPF 孢子懸濁液 50  $\mu$ l ( $10^8$ /ml) もしくは塩化銅 (II) 水溶液 30  $\mu$ l (100 mM) を塗布した。コントロールには蒸留水 30  $\mu$ l を用いた。湿室内、暗条件下、25 °C で 3 日間放置したのち、アセトン 3 ml 中で 2 日間浸漬抽出を行った。得られた抽出液 2 ml からアセトンを窒素気流下で除去し、残渣をエチルエーテル 1 ml で 2 回抽出した。抽出液から再び窒素気流下でエチルエーテルを除去した後、エチルエーテル 0.2 ml を加えて分析試料とした。

#### キャピラリーガスクロマトグラフィーによる分析

得られた試料はそれぞれキャピラリーガスクロマトグラフィー (cGC; 日立 G-5000) を用いて分析を行った。分析にはカラム Quadrex® MS (25 m $\times$ 0.25 mm I.D., 0.25  $\mu$ m film thickness) を用いた。スプリットレス法にて試料溶液 1  $\mu$ l を注入し、移動相をヘリウムガス (線速度 28 cm/min) とした。オープン温度は 120 °C から開始し、3 °C/min で昇温させた後 180 °C で 2 分保持した。注入部および検出部の温度は 280 °C に保った。また化合物の検出には水素炎イオン化検出法 (FID) を用いて行った。Ipomeamarone 標品は 13.0 分に溶出した。抽出試料および ipomeamarone の cGC チャートを Figure 1-2 に示した。

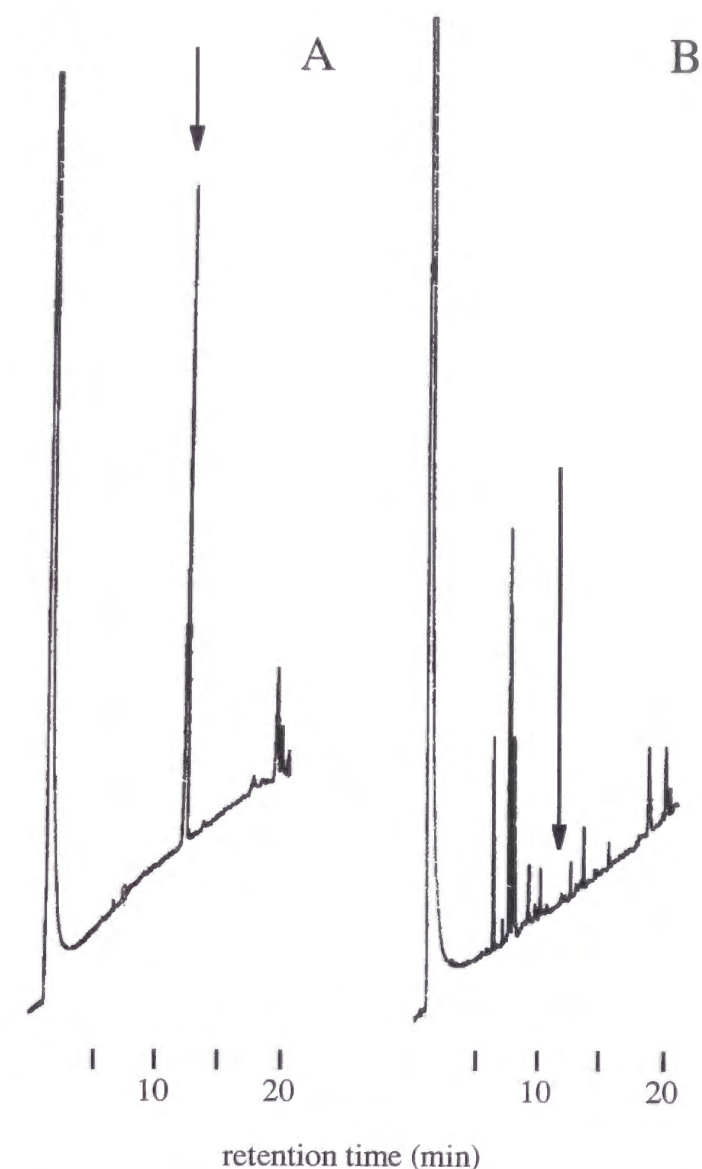


Figure 1-2 Ipomeamarone 標品 (A)およびNPF処理 20 時間後のサツマイモ苗茎部抽出物 (B) のクロマトグラム。矢印は ipomeamarone 標品の溶出時間 (13 min) を示している。



### *Ipomeamarone* の検出限界

*Ipomeamarone* 酢酸エチル溶液をそれぞれの濃度に希釈したものをキャピラリーカラムに注入し、インテグレーターにてピークとして認識されなくなる *ipomeamarone* 最小量を検出限界とした。分析条件は上記と同様に行った。

### PF 孢子発芽阻害試験

*Ipomeamarone*（濃度：100, 10 ppm）を含む 1% (v/v) エタノール, 1% (v/v) ショ糖溶液中に PF 孢子を懸濁し ( $10^5$ /ml) 100 rpm, 25 °C 暗条件下で振盪した。24 時間後、スライドガラス上に懸濁液を移し、顕微鏡にて孢子の発芽を観察した。コントロールには 1 % (v/v) エタノール, 1 % (v/v) ショ糖水溶液を用いた。

### 1-3 結果

#### *Ipomeamarone* の検出限界について

cGC 分析における *ipomeamarone* の検出限界は注入量にして 7.9 ng であった。サツマイモ苗茎部サンプル, 葉部サンプルおよび根塊ディスクがそれぞれ 2.2, 2.2, 1.3 g FW（新鮮重）であったことから計算して, サツマイモ苗（茎部および葉部）では 5.5  $\mu$ g/g FW, 地下部では 12.0  $\mu$ g/g FW が検出限界となる。なお地下部における添加回収実験により *ipomeamarone* 抽出効率を求めたところ定量的（99.6 %）に抽出が行われていることを確認した。

#### 地上部

NPF 処理後のサツマイモ苗は葉にわずかなしおれが見られたが, 移植後これは回復した。NPF 処理と水処理の間に, そのほかの特徴的な違いは見られなかった。塩化銅水溶液に移植すると 2 日後には地上部の葉に激しい黒変が見られた。なお, 塩化銅水溶液に移植後の変化については, 水処理区に比べ NPF を前処理したものは

茎頂周辺の黒変が軽微であった。

サツマイモ苗茎部および葉部アセトン抽出物について *ipomeamarone* の分析を行った結果, 全ての処理区において *ipomeamarone* は検出されなかった。また NPF を前処理し, その後 PF 懸濁液もしくは塩化銅水溶液に浸漬したサツマイモ苗にも *ipomeamarone* は誘導されなかった (Table 1-1)。

#### 地下部

NPF 処理をした地下部では 3 日後に 15.2  $\mu$ g/g FW, 塩化銅水溶液処理区で 9.0  $\mu$ g/g FW の *ipomeamarone* がそれぞれ蓄積していた。コントロールには *ipomeamarone* は検出されなかった (Table 1-1)。

Table 1-1 処理後サツマイモ組織中の *ipomeamarone* 含量

処理	地上部	根部
対照	nd <sup>a)</sup>	nd
NPF	nd	15.2
PF	nd	— <sup>b)</sup>
CuCl <sub>2</sub>	nd	9.0

数値は処理後組織中の *ipomeamarone* 含量 ( $\mu$ g/gFW) を表している。根ディスクは処理後 3 日間保持した後抽出した。NPF 孢子懸濁液 ( $10^8$ /ml, 50  $\mu$ l) もしくは塩化銅水溶液 (100mM, 30  $\mu$ l) をディスクに処理した。地上部は NPF 孢子懸濁液 ( $10^8$ /ml), PF bud-cells ( $10^5$ /ml) もしくは塩化銅水溶液 (25 mM) に 20 時間浸漬した。そのち蒸留水に移植しさらに 2 日間保持した。

a) 検出されず

b) 測定値なし

#### *Ipomeamarone* の PF 胞子発芽抑制効果

PF 胞子発芽率はコントロールで 72 % であった。これに対し *ipomeamarone* 100 ppm 処理区では、発芽率が 56 % に低下し発芽抑制効果が見られた。この効果は 10 ppm 処理区では 71 % であった。

#### 1-4 考察

NPF と地下部組織との相互作用の結果、*ipomeamarone* が誘導された。したがって他の品種と同じくベニコマチに *ipomeamarone* 生合成能が存在し、地下部においても NPF との何らかの相互作用は存在するものと思われる。

サツマイモ苗の *ipomeamarone* 含量を各処理後 20 時間後に測定した結果、どの処理区から検出されなかった。サツマイモ苗には 20 時間処理の後に高い抵抗性が獲得されている。この抵抗性獲得状態にあるにも関わらず *ipomeamarone* はサツマイモ苗からは検出されなかった。*Ipomeamarone* の PF 胞子発芽抑制効果は 100 ppm でわずかに見られたが、10 ppm では見られなかった。本実験における *ipomeamarone* の最低検出量は茎部および葉部においては 5.5  $\mu\text{g/g}$  FW であったことを考慮すると、発芽抑制に有効な濃度に *ipomeamarone* が蓄積する可能性は低いと思われる。したがって本抵抗性に *ipomeamarone* は関与していないと結論した。

小川は NPF 処理後のサツマイモ苗茎部抽出物に PF 発芽抑制活性を認めている (Ogawa, 1988)。また Clark らによって病原を接種したサツマイモ地上部に *ipomeamarone* 代謝関連物質と思われる成分が薄層クロマトグラフィー上で見出されたという報告がなされている (Clark et al., 1981)。*Ipomeamarone* の生合成および代謝に関する研究がなされており、いくつかの前駆体もしくは代謝産物と思われる成分が単離、構造決定されている (Figure 1-1, Kato et al., 1971; Yang et al., 1971; Oguni and Uritani, 1973; Burka et al., 1974; Burka and Iles, 1979)。その中の *ipomeamaronol* は代謝産物、*dehydro ipomeamarone* は前駆体であると考えられている (Schneider et al., 1984)

。いずれの化合物にも *ipomeamarone* と同様の活性が見出されていることから (Burka et al., 1974)、サツマイモ茎部に見られた抗菌活性はこれら関連代謝産物によるものかもしれない。サツマイモ組織中でフラノテルペン類として定量される成分のうちで抗菌活性についての報告があるものは *ipomeamaronol* および *dehydro ipomeamarone* についてのみである (Arinze and Smith, 1980)。今後抵抗性獲得状態にある地上部に含まれるこれらの類縁体およびそのほかの抗菌成分の分析が必要である。

#### 1-5 合成の部

##### 1-5-1 合成の手順

*Ipomeamarone* 標品の合成は 3-furoic acid を出発物質として Figure 1-3 に示した経路で行った。

##### 3-Furoyl chloride (1)

3-Furoic acid 15.7 g (0.14 mol) を 100 ml 容ナスフラスコに入れ、これに thionyl chloride 50 ml (0.7 mol) を加えた。容器に冷却管 (乾燥管付き) を取り付け、70 °C で 3 時間還流した。加熱開始後直ちに furoic acid が溶解し、褐色の溶液になると共に塩化水素が発生した。過剰の thionylchloride を留去した後、減圧蒸留により目的化合物 14.7 g (bp. 82-85 °C/80 mmHg) を得た。(収率 80 %)

性状：無色結晶

IR (film) $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 1760, 1160, 800

##### Ethy1 3-(3'-fury1)-3-oxoproponoate (3)

温度計、滴下漏斗、アルゴンガス導入管を装着した 500 ml 容の四頸フラスコを用意した。セプタムで密閉し内部をアルゴンで置換した。反応はアルゴン雰囲気下で行った。乾燥 THF 200 ml, 1,1,1,3,3,3-hexamethyldisilazane 25.4 ml (0.12 mol) を注入した後、水冷しつつ 5 °C 以下で *n*-butyllithium 78 ml (0.12 mol) を滴下した。30 分



間攪拌の後、ドライアイス/メタノール浴で  $-70^{\circ}\text{C}$  に冷却した。乾燥酢酸エチル 5.90 ml (60 mmol) を滴下し、さらに 1.5 時間攪拌した。乾燥 THF 50 ml で希釈した 3-furoyl chloride 7.15 g (55 mmol) をゆっくり滴下し 30 分間攪拌を続け、飽和塩化アンモニウム水溶液 60 ml を注ぎ反応を停止した。冷却を止め徐々に室温に戻した後、3*N* 塩酸 80 ml で酸性化しエーテルで抽出した。エーテル層を飽和食塩水で洗い、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。減圧下で濃縮することにより得られた残渣から、減圧蒸留により目的化合物 8.87 g (bp.  $89-96^{\circ}\text{C}/0.8\text{ mmHg}$ ) を得た。(収率 89 %)

性状：無色液体

$^1\text{H-NMR}$  (chloroform-*d*) :  $\delta$  (ppm) 1.28 (3H, t,  $J=7.1\text{Hz}$ ),

3.76 (2H, s), 4.21 (2H, q,  $J=7.1\text{Hz}$ ),

6.78 (1H, dd,  $J=1.8, 0.8\text{Hz}$ ), 7.45 (1H, m), 8.09 (1H, m)

IR (film)  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) : 1740, 1680, 1560, 1510

#### 4-(3'-Furyl)-4-oxobutanoic acid (5)

100 ml 三頸フラスコに sodium hydride 2.14 g (60 % 油性, 54 mmol) を入れ、少量のヘキサンで 3 回洗浄した。容器に三方コック、滴下漏斗を装着した後、セプタムで密閉した。三方コックに、アルゴンを充填した風船と水流ポンプをつなぎ、内部をアルゴンで置換した。反応はアルゴン雰囲気下で行った。乾燥 THF 60 ml を注入し、内容物を攪拌して懸濁液とした後、滴下漏斗より乾燥 THF 10 ml で希釈した ethyl 3-(3'-furyl)-3-oxopropanoate (3) 9.10 g (50 mmol) を少量ずつ滴下した。

30 分後、乾燥 THF 10 ml で希釈した ethyl bromoacetate 10.7 g (64 mmol) を少量ずつ滴下し、全量滴下後も更に一晩攪拌を続けた。1*N* 塩酸 40 ml を加え反応を停止してからエーテルで抽出し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した後、濃縮することにより淡黄色油状の粗生成物 13 g を得た。これをアセトン 10 ml で希釈し 6*N* 塩酸 20 ml を加え、 $80^{\circ}\text{C}$  で一晩還流した。反応液を室温に戻し、エバポレーターでアセトンを減圧下で除いてからエーテルで抽出した。次いでエーテル層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で洗浄し洗液(水層)を合一した後、濃塩酸で酸性化した。

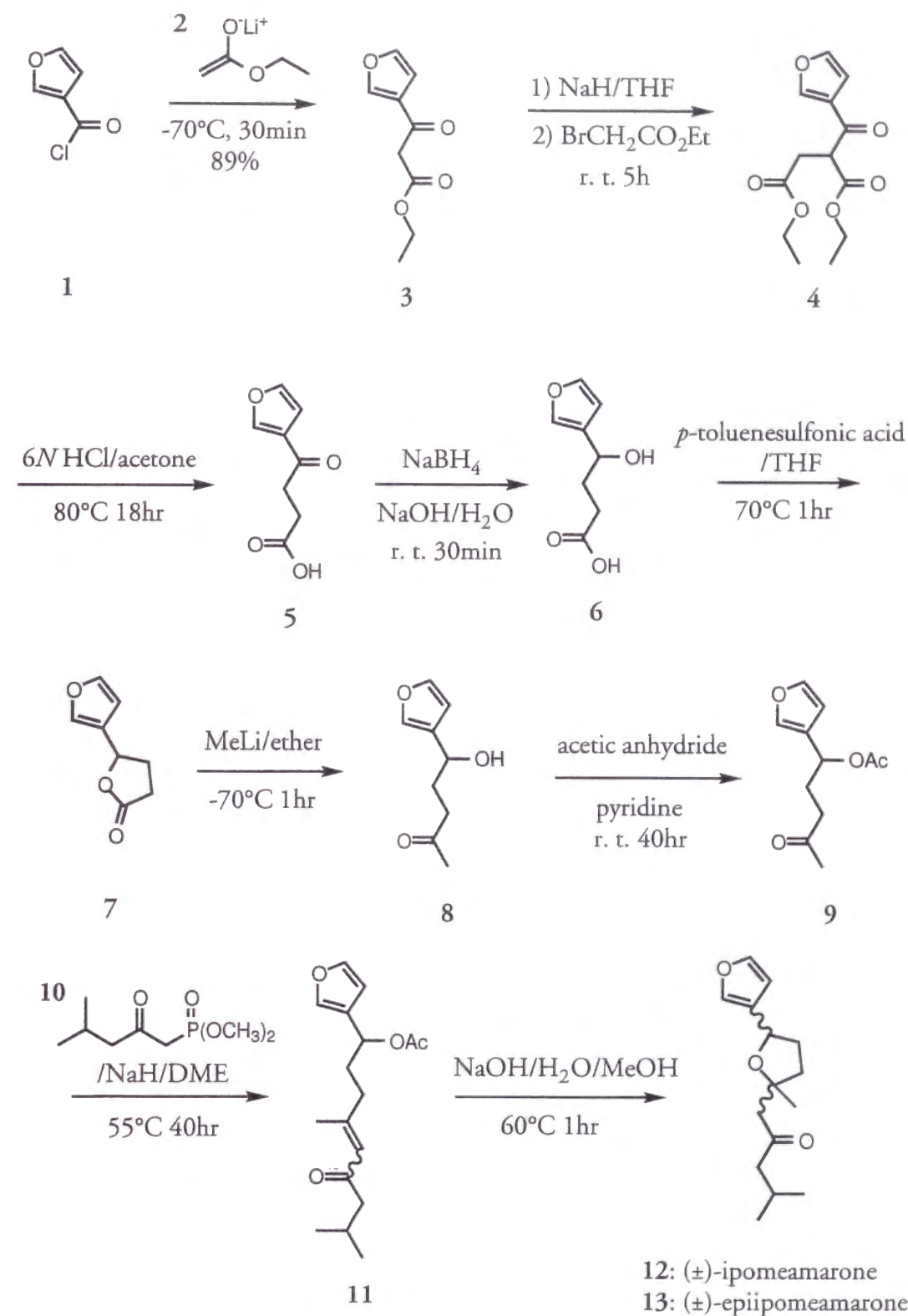


Figure 1-3 ipomeamarone の合成

これをエーテルで抽出し、エーテル層を硫酸マグネシウムで乾燥した後、濃縮する事により目的化合物 5.40 g を得た。(収率 63 %)

性状：淡黄色結晶

$^1\text{H-NMR}$  (chloroform-*d*) :  $\delta$  (ppm) 2.78 (2H, d,  $J=6.8\text{Hz}$ ),  
3.09 (2H, d,  $J=6.9\text{Hz}$ ), 6.78 (1H, dd,  $J=1.8, 0.8\text{Hz}$ ),  
7.45 (1H, m), 8.07 (1H, m)

#### $\gamma$ -(3'-Furyl)- $\gamma$ -butyrolactone (7)

200 ml 容ナスフラスコに水酸化ナトリウム水溶液(蒸留水 50 ml に水酸化ナトリウム 1.3 g を溶かしたもの)を入れ、これに 4-(3'-furyl)-4-oxobutanoic acid (5) 5.00g (29 mmol) を加え、攪拌して完全に溶解させた。0.2 *N* 水酸化ナトリウム水溶液 10 ml に懸濁させた sodium borohydride 1.30 g (35 mmol) を少量ずつ加え、室温で 30 分間攪拌した。溶液は赤褐色から黄褐色へと変化した。反応液を 3 *N* 塩酸で酸性化しエーテルで数回抽出した後、水層を食塩で飽和しさらにエーテルで抽出した。エーテル層を合一し、無水硫酸マグネシウムで乾燥後、エバポレーターで減圧下濃縮した。約 20 g にまで濃縮した後、乾燥 THF を 60 ml, *p*-toluenesulfonic acid monohydrate を小スパテラー杯分加え、70 °C で 1 時間還流した。反応液をエバポレーターを用いて減圧下に濃縮し、残渣 5 g をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(ゲル 200 g, 溶出溶媒ヘキサン：エーテル= 1:2) によって精製することにより、目的化合物 3.32 g を得た。(収率 75 %)

性状：無色油状物

$^1\text{H-NMR}$  (chloroform-*d*) :  $\delta$  (ppm) 1.83-2.40 (1H, m),  
2.51-2.66 (3H, m), 5.46-5.50 (1H, m),  
6.41 (1H, dd,  $J=1.8, 0.8\text{Hz}$ ), 7.43-7.48 (2H, m),  
IR (film)n (cm<sup>-1</sup>) : 1770, 1180, 1160, 920

#### Ipomeanol acetate (9)

100 ml 容三頸フラスコに  $\gamma$ -(3'-furyl)- $\gamma$ -butyrolactone (7) 3.04 g (20 mmol) を入れ、温度計、滴下漏斗およびアルゴンガス導入管を装着し、容器をセプタムで密閉した後、内部をアルゴンで置換した。反応はアルゴン雰囲気下で行った。乾燥エーテル 60 ml を注入し均一な溶液としてから、ドライアイス/メタノール浴で -70 °C 以下に冷却し、methyllithium 16 ml (1.4 M エーテル溶液, 22 mmol) を少量ずつ滴下した。この時、溶液が少し白濁した。30 分後冷却を止め、徐々に室温に戻してから蒸留水 4 ml を加えた。水層を除きエーテル層を硫酸マグネシウムで乾燥後、エバポレーターで減圧下約 30 g にまで濃縮した。濃縮後、カラムクロマトグラフィー(溶出溶媒ヘキサン：酢酸エチル= 2:1) により精製する事も可能であったが、濃縮時に副生成物が生じるのを防ぐため直ちに次の操作を行った。粗生成物のエーテル溶液 30 g にピリジン 30 ml, 無水酢酸 12 ml を加え室温で二晩攪拌した。特に後処理を行わずそのままエバポレーターで減圧下約 5.0 g にまで濃縮し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(ゲル 300 g, 溶出溶媒ヘキサン：エーテル= 3:2) で精製する事により目的化合物 2.13 g を得た。(収率 51 %)

性状：淡黄色油状物

$^1\text{H-NMR}$  (chloroform-*d*) :  $\delta$  (ppm) 2.04 (3H, s),  
2.15 (3H, s), 2.06-2.17 (2H, m), 2.43-2.49 (2H, m),  
5.77 (1H, t,  $J=6.8\text{Hz}$ ), 6.38 (1H, m), 7.37-7.42 (2H, m)

#### Dimethyl 2-oxo-4-methylpentanephosphonate (10)

温度計、滴下漏斗およびアルゴンガス導入管を装着した 300 ml 容四頸フラスコを用意し、内部をアルゴンで置換した後、乾燥 THF 100 ml を注入した。反応はアルゴン雰囲気下で行った。水冷下 0 °C で butyllithium 63 ml (100 mmol) を加え、ドライアイス/メタノール浴で -70 °C 以下に冷却した後、dimethyl methylphosphonate 11.0 ml (100 mmol) を滴下漏斗より少量ずつ加えた。30 分後、白色懸濁液となった反応溶液に ethyl isovalerate 7.5 ml (50 mmol) を少量ずつ滴下し、全量滴下し終わってから 1 時間で冷却を止め、室温でしばらく放置した。Ethyl isovalerate の滴下により、溶



液は透明になった。0℃で飽和塩化アンモニウム水溶液 40 ml を加え、よく攪拌してからジクロロメタンで数回抽出した。有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水の順で洗い無水硫酸マグネシウムで乾燥した。エバポレーターで減圧濃縮し、残渣から減圧蒸留により目的化合物 8.63 g (81-84℃/0.15 mmHg) を得た。(収率 83 %)

性状：無色液体

<sup>1</sup>H-NMR (chloroform-*d*) : δ (ppm) 0.93 (6H, d, *J*=6.7Hz),  
2.15 (1H, m), 2.50(2H, d, *J*=6.8Hz), 3.17 (2H, d, *J*=22.6Hz),  
3.79 (6H, d, *J*=11.2Hz)

IR (film)ν (cm<sup>-1</sup>) : 2950, 1710, 1260, 1150

#### Acetyl iso ipomeamarone (11)

50 ml 容二頸フラスコに sodium hydride 0.52 g (60 % 油性, 13 mmol) を入れ、少量のヘキサンで3回洗浄した。上端に三方コックを付けた冷却管を取り付け、容器をセプタムで密閉した。三方コックに、アルゴンを充填した風船と水流ポンプをつなぎ内部をアルゴンで置換した。反応はアルゴン雰囲気で行った。シリンジを用いてセプタム部から、乾燥 1,2-dimethoxyethane (DME) を 12 ml 注入し、内容物を攪拌して懸濁液とした。乾燥 DME 2 ml で希釈した dimethyl 4-methyl-2-oxopentane-phosphohate (10) 2.62 g (13 mmol) をシリンジで少量ずつ加えた。この時、激しく気泡が発生したので、三方コックを少し開いて内圧があまり高くないようにした。約 15 分で気泡の発生が止まり、反応液が均一な溶液になったところで乾燥 DME 2 ml で希釈した ipomeanol acetate (9) 1.47 g (7 mmol) をシリンジで加え、55℃で 40 時間反応させた。時間の経過に伴い溶液は褐色になると同時に濁りを生じた。後処理は行わず、反応溶液をそのままシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ゲル 200 g, 溶出溶媒ヘキサン：エーテル=4:1) を行った。3種類の生成物 (*R<sub>f</sub>* 値 0.28-0.36) が存在するが、それらは (*E*)-11と (*Z*)-11, および (epi) ipomeamarone と考えられ、分離せず混合物の状態で回収した。溶媒を留去し 0.96 g の油状物を得た。(粗収率 47 %)

以下に示した NMR のデータは、精製した (*E*)-11 についてのものである。

性状：淡黄色油状物

<sup>1</sup>H-NMR (chloroform-*d*) : δ (ppm) 0.92 (6H, d, *J*=6.6Hz),  
1.80-2.00 (1H, m), 2.05 (3H, s), 2.04-2.17 (7H, m),  
2.28 (2H, d, *J*=6.8Hz), 5.76 (1H, m), 6.2 (1H, d, *J*=1.1Hz),  
6.39 (1H, m), 7.38-7.42 (2H, m)

IR (film)ν (cm<sup>-1</sup>) : 1750, 1630, 1250

#### (±)-Ipomeameamarone (12) と(±)-epi ipomeamarone (13)

未精製の acetyl iso ipomeamarone (11) 0.93g (3.2mmol) を 100ml 容ナスフラスコに入れ、メタノール 20ml, 1*N* 水酸化ナトリウム水溶液 15ml を加えた。60℃で1時間還流した後、メタノールを減圧下に留去した。メタノールが留去されると、反応液は白濁した。エーテルで数回抽出し、エーテル層を無水硫酸マグネシウムで乾燥した。エーテルを減圧留去し、得られた 1.5g の残渣を、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (ゲル 60g, 溶出溶媒ヘキサン：エーテル=5:1) により精製し、0.68g の目的化合物を得た。(収率 40%/2段階)

性状：淡黄色油状物

<sup>1</sup>H-NMR (chloroform-*d*) : δ (ppm) 0.87-0.92 (12H, m),  
1.34 (6H, d, *J*=1.4Hz), 1.83-2.02 (4H, m), 1.03-2.30 (6H, m),  
2.31-2.37 (4H, m), 2.67 (4H, dd, *J*=15.0, 28.8Hz),  
4.90 (2H, m), 6.36 (2H, d, *J*=0.9Hz), 7.37 (4H, m)  
<sup>1</sup>H-NMR (methanol-*d*<sub>4</sub>) : δ (ppm) 0.86 (3H, d, *J*=6.7Hz),  
0.87 (3H, d, *J*=6.7Hz), 0.87 (3H, d, *J*=6.7Hz),  
0.91 (3H, d, *J*=6.7Hz), 1.31 (6H, s), 1.8-2.3 (10H, m),  
2.26 (2H, d, *J*=6.9Hz), 2.39 (2H, d, *J*=6.9Hz) 2.6-2.8 (4H, m),  
4.92 (2H, dd, *J*=7.8, 6.0Hz), 6.41 (2H, m), 7.43 (2H, m)

元素分析：C, 71.67 ; H, 8.88 (理論値 C, 71.97 ; H, 8.86)



## (±)-Ipomeamarone (12) と(±)-epi ipomeamarone (13) の分離

逆相 HPLC を用い分取した。カラムは COSMOSIL 5C18-AR (250×20mm I.D.) を 40℃ に保ち用いた。移動相にはアセトニトリル / 5% THF 水溶液混合溶媒 (混合比 12/13) を用い流速 8 ml/min を保った。ピークの検出は UV 230 nm で行った。試料はジアステレオマー混合物をメタノールで希釈し、16 mg/ml の濃度にしたものを注入した。分取後アセトニトリルをエバポレーターで減圧下留去し、残った水層を食塩で飽和した。これをエーテルで抽出し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した後、減圧下で濃縮した。<sup>1</sup>H-NMR を測定し、イソプロピル基のメチルプロトンのシグナルから、先に溶出する成分が **12** で (8.0 mg)、後から溶出する成分が **13** (6.9 mg) であると同定した。**12** および **13** のデータを以下に示す。

**12** <sup>1</sup>H-NMR (chloroform-*d*) : δ (ppm)

0.88 (3H, d, *J*=6.6Hz), 0.89 (3H, d, *J*=6.6Hz),

1.33 (3H, s), 1.8-2.3 (6H, m), 2.32 (2H, d, *J*=6.1Hz),

2.68 (2H, dd, *J*=28.9, 14.9Hz), 4.92 (1H, dd, *J*=7.5, 6.6Hz),

6.36 (1H, m), 7.37 (2H, m)

**13** <sup>1</sup>H-NMR (chloroform-*d*) : δ (ppm)

0.91 (6H, d, *J*=6.6Hz), 1.34 (3H, s), 1.9-2.3 (6H, m),

2.36 (2H, d, *J*=6.9Hz), 2.70 (2H, s),

4.89 (1H, dd, *J*=8.4, 5.4Hz), 6.36 (1H, m), 7.37 (2H, m)

## 2. 非病原性 *Fusarium* によって誘導される交叉抵抗性の簡便なモデル系の確立

### 2-1 緒論

非病原性 *Fusarium* (non-pathogenic *Fusarium*; NPF) によってもたらされる抵抗性はサツマイモつる割れ病に対して高い防除効果を示し、現在 NPF をサツマイモ苗に前処理する防除法が実用化されている (Ogawa, 1988)。また、サツマイモ (Ogawa and Komada, 1984) だけでなくホウレンソウ (Katsube and Akasaka, 1997)、カーネーション (Baker et al., 1978)、キウリ (Gessler and Kuć, 1982) やトマト (Watanabe et al., 1991) などにも NPF によって抵抗性が誘導されることが報告されている。しかし NPF-植物-病原の三者の間の相互作用を詳細に検討した事例は少ない。したがって、NPF の有する抵抗性誘導因子や、植物側が誘導する各種抵抗反応、さらには病原性を決定する因子など不明な点が数多く残されている。これらに関する詳細を明らかにし、応用してゆくことは植物防疫上、大変有用であると考えられる。

これまでサツマイモに誘導される抵抗性に関して生化学的に詳細が研究が行われなかった理由の一つには、サツマイモは検定植物としての取り扱いが困難であるという点が挙げられる。本現象はサツマイモ地上部に見られるが、この地上部は一般にサツマイモ根塊を植え付けて、芽生えてきたものを使用する。この方法、試料調製にかなりの時間を要する。また温室内プランターで栽培したサツマイモ苗を用いると結果的に再現性が得られなかった。そこでより取り扱いが簡便で試料の均一性のある他の植物を用いたモデル系の確立が必要であると考えられた。

サツマイモつる割れ病菌 (PF) はサツマイモだけでなくソライロアサガオにも病原性を示すことが報告されている (Ogawa, 1988)。ソライロアサガオは市販の種子から栽培することができ、均一で扱いやすく植物試料として適していると考えられた。そこで本章では NPF によって誘導される植物の抵抗性に関する研究のためのモデル植物としてソライロアサガオを用いた検定系の確立を試みた。

## 2-2 材料および方法

### 2-2-1 植物試料

サカタのタネより購入したソライロアサガオ (*Ipomoea tricolor* cv. heavenly blue) の種子をパーミキュライト上に播種した。適宜 0.1 % (v/v) HYPONeX® 水溶液で給水し、25 °C 明条件下で 7 日間栽培し芽生えを得た。この芽生えをカミソリにて子葉および基部 5 cm を有した地上部を採取し、植物体試料として供試した。

### 2-2-2 菌体試料

保存菌体は平板ジャガイモ-しょ糖-寒天培地にて保存した。この保存菌株、非病原性フザリウム (*Fusarium oxysporum* 101-2 : NPF) もしくはサツマイモつる割れ病菌 (*F. oxysporum* f.sp. *bataas* O-17 : PF) をそれぞれジャガイモ-しょ糖液体培地 100 ml に接種し 7 日間 28 °C, 100 rpm で振盪培養した。これをガーゼ 1 枚でろ過し、50 ml 容プラスチック遠心チューブにとり 3,000 × G, 10 分間遠心し胞子を集めた。これを滅菌水にて懸濁し目的の胞子密度に調整し菌体処理液として用いた。

### 2-2-3 植物の処理および病徴の評価法

ソライロアサガオ幼苗の切り口基部を PF 胞子懸濁液に浸漬し 25 °C 明条件下で保持した。コントロールには滅菌水を用いた。任意の時間が経過した後幼苗の葉を 80 % (v/v) アセトン水溶液 5 ml に浸漬し室温で一晩放置した。得られた抽出液の吸光度を 645 および 663 nm において測定し、以下の式 (Arnon, 1949) にしたがって葉緑素量を算出した。

$$\text{葉緑素量 (mg/l)} = 20.2 A_{645} + 8.02 A_{663}$$

葉部新鮮重あたりの葉緑素量を黄化の指標として病徴の評価を行った。

### 2-2-4 NPF 前処理による病徴抑制効果

ソライロアサガオ幼苗の切り口基部を NPF 胞子懸濁液に浸漬し 25 °C 明条件下で保持したのち、PF 胞子懸濁液 (10<sup>5</sup> 胞子/ml, 含 0.05 % HYPONeX® 水溶液) に移植した。さらに 7 日間 25 °C 明条件下で保持したのち葉部を前述の方法に従って抽出し、葉部葉緑素含量を算出した。

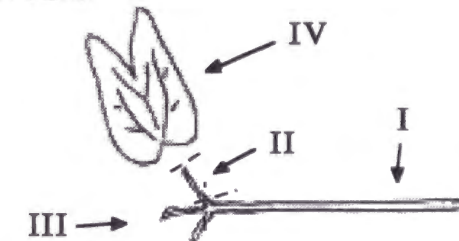
### 2-2-5 ソライロアサガオ体内での PF の分布

NPF 処理もしくは滅菌水処理を 20 時間行ったのち、PF 胞子懸濁液に移植して 12 日間保持したソライロアサガオ幼苗を Table 2-1 に示すように各部分に切り分けた。

Table 2-1 PF 処理後ソライロアサガオ体内の *Fusarium* の分布

前処理	I	II	III	IV
蒸留水	+	+	+	+
NPF	+ <sup>a)</sup>	—	—	—

NPF の前処理は 10<sup>8</sup> bud-cell/ml で行った。ソライロアサガオ幼苗は下に示したように 4 つの部分 (I: 基部, II: 葉柄, III: 茎頂部分および第一葉, IV: 子葉) に切りわけ、それぞれを駒田培地上に静置し 7 日間培養した。そしてコロニー形成を観察した。



a) PF と NPF は区別できなかった。



これを次亜塩素酸水溶液（有効塩素濃度 0.4 %）中で 5 秒間、次に 70 % エタノール水溶液中で 5 秒間保持し表面を殺菌した後、それぞれをフザリウム菌選択培地・駒田培地 (Komada, 1976) に着床した。これを 25 °C、明条件下で 7 日間培養したのち、培地上の菌叢を観察し、*Fusarium* を検出した。

## 2-2-6 駒田培地の調製

既報の方法（獅山，1989）に従って、以下に示す組成および操作（Table 2-2）で駒田培地を調製した。

Table 2-2 駒田培地の調整法

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 g
KCl	0.5 g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.5 g
Fe-EDTA	10 mg
L-アスパラギン	2 g
D-ガラクトース	20 g
寒天	15 g

蒸留水 1 l に溶かし、オートクレイブを 120 °C で 10 分行う。滅菌終了後 45 – 50 °C 程度にまで冷やした後、PCNB（pentachloronitrobenzene 75 % 水和剤）1 g，コール酸ナトリウム 0.5 g，Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> · 10H<sub>2</sub>O を 1 g，硫酸ストレプトマイシン 0.3 g をそれぞれ加え溶解させた後シャーレに分注する。なお PCNB 剤は現在販売が中止されていたため、茨城県農業総合センター渡邊健氏よりいただいたものを使用した。

## 2-3 結果

### 2-3-1 ソライロアサガオに対する PF の病原性

PF の有するソライロアサガオに対する病原性を検討した。播種後 7 日のソライロアサガオから採取した幼苗の切り口基部を PF 孢子懸濁液（10<sup>5</sup> /ml）に浸漬した。



NPF 処理区  
(10<sup>8</sup> 孢子/ml)

対照処理区

Figure 2-1 PF 処理 10 日後のソライロアサガオ子葉に見られる病徴。  
ソライロアサガオ幼苗に対して、NPF 処理（10<sup>8</sup> 孢子/ml），対照処理（蒸留水）をそれぞれを 20 時間行い，PF 孢子懸濁液（10<sup>5</sup> 孢子/ml）に移し 10 日間保持した。



PF 処理開始より 4 日目に子葉の外縁が黄化し始め、7 日目には黄化は子葉全体に広がった。この時、外縁には褐変壊死する部分も見られた。10 日目には全ての幼苗で萎れが見られ、子葉全体が黄化した (Figure 2-1 右)。この症状は子葉中の葉緑素含量と相関が見られた。4 日目から対照区と PF 処理区で葉緑素含量に顕著な差が見られ始め、7 日目には PF 処理区の子葉の葉緑素含量は蒸留水処理区の約 1/2 であった。黄化の強度 (葉緑素量の減少) は処理 PF の孢子密度に依存して変化した (Figure 2-2)。これに基づいて、以下の実験で PF のソライロアサガオに対する効果を子葉中に含まれる葉緑素量を指標として評価した。

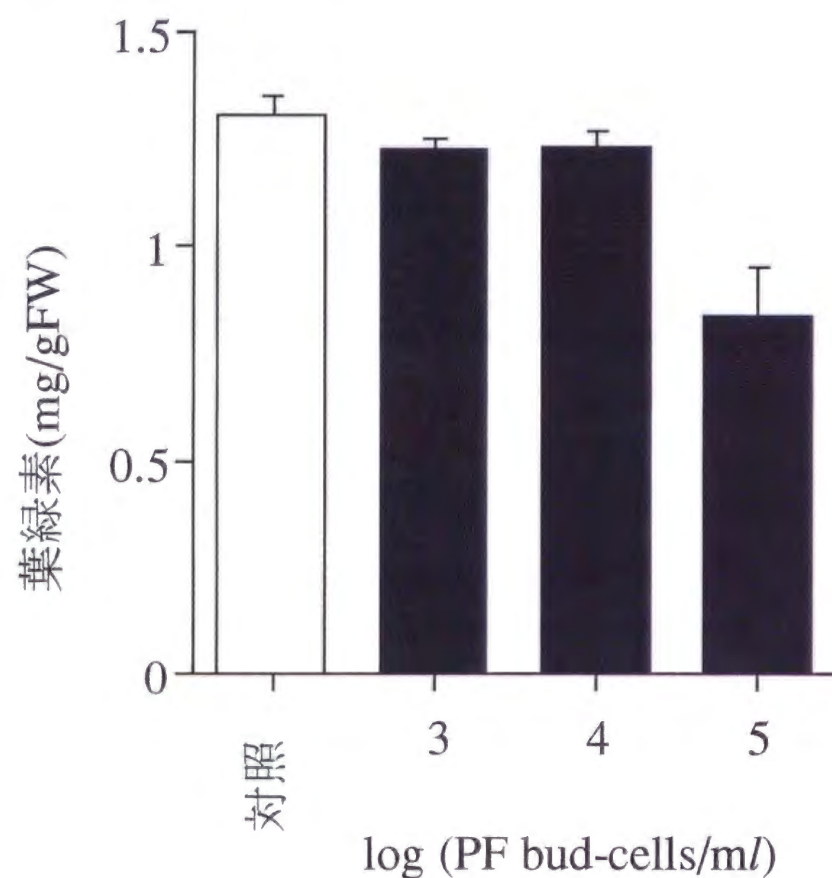


Figure 2-2 処理 PF 孢子密度とソライロアサガオ子葉内の葉緑素含量。  
それぞれの値は PF 処理 7 日後の葉緑素量の平均値を標準誤差 (n=3) とともに表している。横軸は処理 PF 孢子密度、縦軸は新鮮重あたりの葉緑素量 (bud-cells/ml) を表している。対照は蒸留水を処理したことを表している。

### 2-3-2 NPF の前処理による黄化の抑制効果

NPF 孢子懸濁液 ( $10^8/\text{ml}$ ) にソライロアサガオ幼苗の切り口基部を 20 時間前処理すると、PF による子葉の黄化が明らかに抑制された (Figure 2-1)。また NPF 処理はソライロアサガオ幼苗に対して外観上変化を引き起こさなかった。NPF 処理を行わなかった処理区では PF 処理によって徐々に葉緑素の減少が見られたが、NPF 処理を行った処理区では PF 処理を続けて行ってもわずかに減少するだけであった (Figure 2-3)。この減少は滅菌水処理区の減少と差がなかった。PF 処理 7 日後の葉緑素含量は NPF 前処理区は蒸留水前処理区に対して約 2 倍の葉緑素を保持していた。この抑制効果は行った前処理の NPF 孢子密度に依存した (Figure 2-4)。NPF 孢子懸濁液の孢子密度を  $10^3 - 10^9/\text{ml}$  で処理を行ったところ、PF による葉緑素の減少の抑制効果は NPF 孢子密度が  $10^4/\text{ml}$  程度では見られなかったものの、 $10^5/\text{ml}$  から徐々に上昇し、 $10^7/\text{ml}$  で顕著な減少は見られなくなった。NPF 前処理の時間を変化させることによる黄化抑制効果が見られた。NPF 孢子懸濁液 ( $10^8/\text{ml}$ ) を 5 秒間もしくは 6 - 20 時間切り口基部に処理した後、PF 処理を行った (Figure 2-5)。6 時間処理ではわずかに 20 時間処理に満たないものの、14 時間以上の処理区においては 20 時間処理と同程度の黄化抑制効果が見られた。また 5 秒間 NPF 孢子懸濁液に保持した処理区においても明らかな葉緑素減少の抑制効果が見られた。

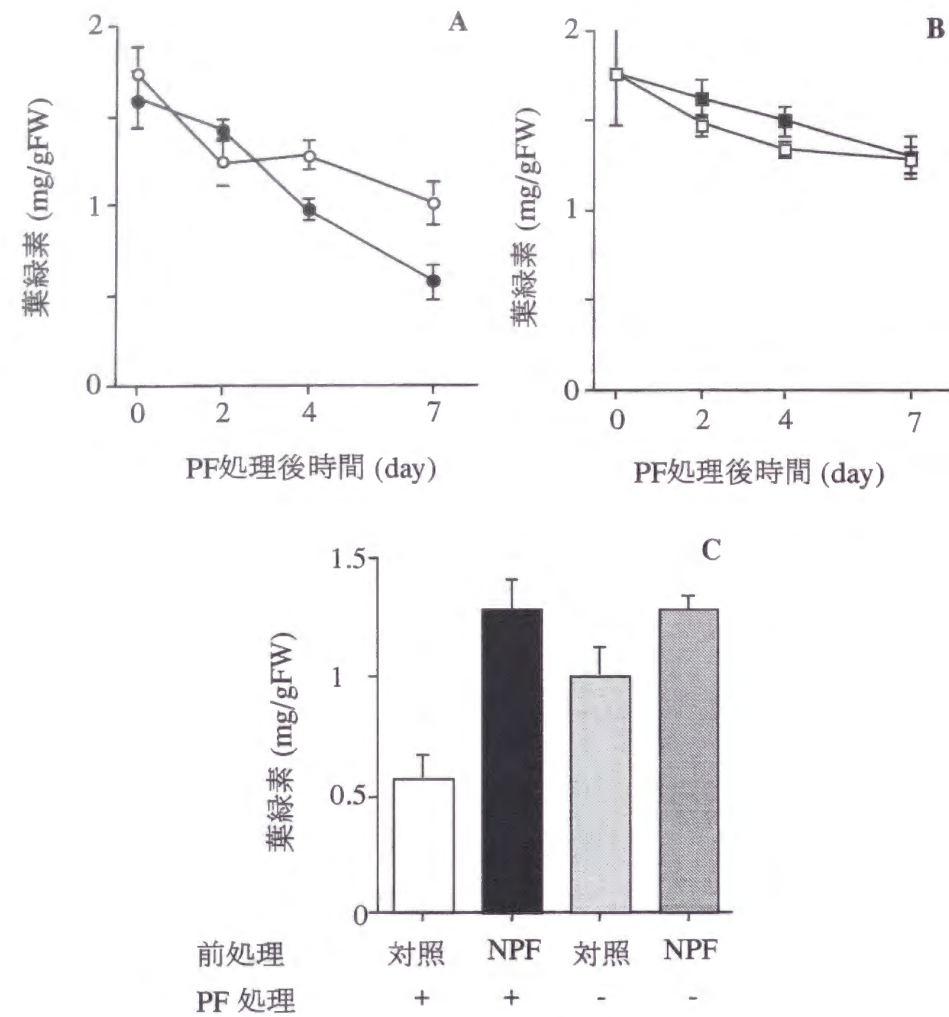


Figure 2-3 子葉中の葉緑素含量の経時変化.

それぞれの値は新鮮重あたりの葉緑素量 [標準誤差 (n=3)] で表した. A: 蒸留水 20 時間処理後の葉緑素量変化. 蒸留水処理後, 蒸留水に移植した処理区 (○), PF 胞子懸濁液 ( $10^5$  bud-cells/ml) に移植した処理区 (●). B: NPF 20 時間処理後の葉緑素量変化. NPF 処理後, 蒸留水に移植した処理区 (□), PF 胞子懸濁液 ( $10^5$  bud-cells/ml) に移植した処理区 (■). C: PF 処理後 7 日の葉緑素含量.

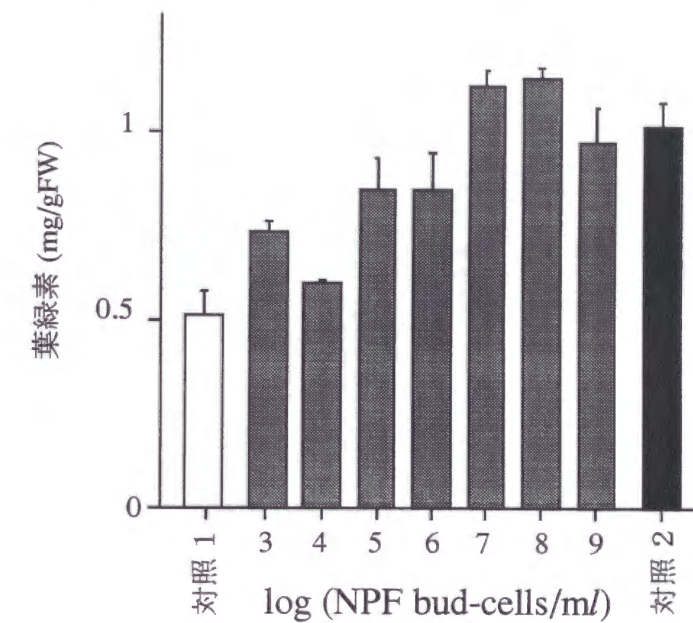


Figure 2-4 NPF 胞子密度と病徴の抑制効果 (葉緑素減少の抑制).

横軸は処理した NPF 胞子密度の対数値を, 縦軸は各前処理後, PF 処理 7 日後の子葉中の葉緑素含量を標準誤差 (n=3) とともに表している. 対照 1 は蒸留水を 20 時間処理した後 PF を行った処理区である. 対照 2 は蒸留水処理の後, もう一度蒸留水処理を行った処理区である.



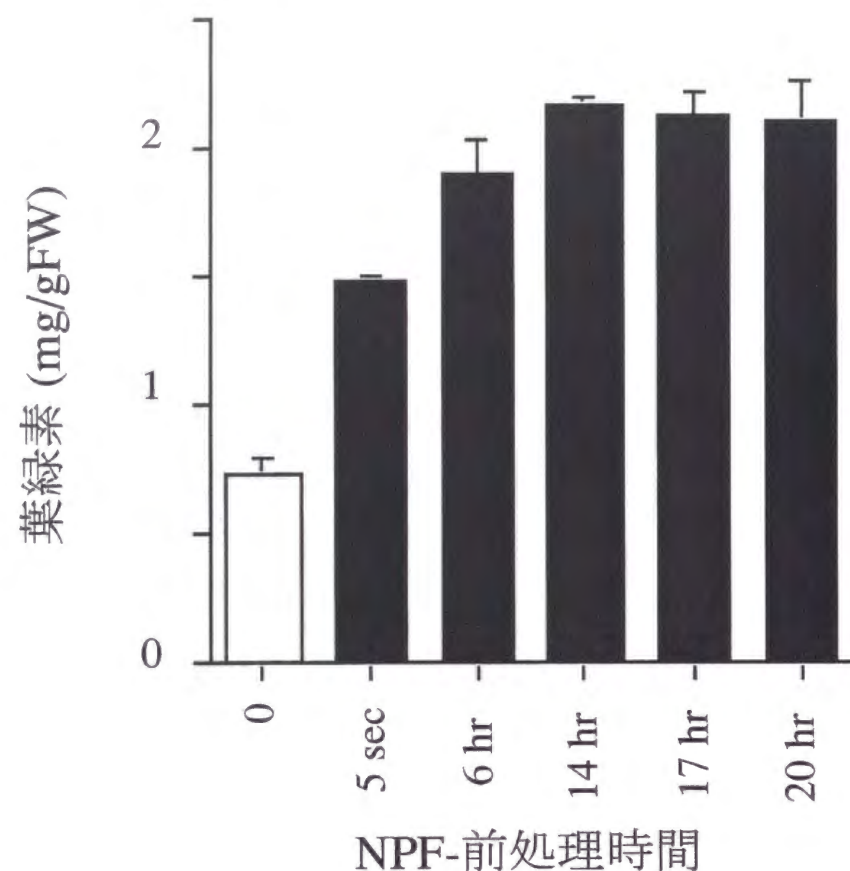


Figure 2-5 NPF の処理時間と病徴の抑制効果（葉緑素減少の抑制）。  
横軸は NPF 処理 ( $10^8$  bud-cells/ml) を行った処理時間を、縦軸は PF 処理 7 日後の子葉中の葉緑素含量を標準誤差 ( $n=3$ ) とともに表している。

### 2-3-3 Fusarium のソライロアサガオ体内からの検出

Table 2-1 (p 23 参照) に示したようにソライロアサガオの各部分 (I-IV) を駒田培地上で培養し PF 菌の検出を行った結果を示した。蒸留水を前処理した後、PF 処理を 12 日間行った処理区では葉部に激しい黄化と萎れを生じた。この幼苗から採取した I-IV 全ての周辺に PF のコロニーが形成され、PF が検出された。一方、NPF を前処理し PF 処理を 12 日間行った幼苗では PF による病徴は見られなかった。この幼苗では I の部分からのみ *Fusarium* が検出されたが II-IV の部分からは *Fusarium* のコロニーは形成されなかった。なおこの I で検出されたコロニーについて、PF と NPF を区別することはできなかった。

### 2-4 考察

NPF はサツマイモつる割れ病を防除する生物防除剤として高い効果を有している (Ogawa, 1988)。植物の有している病原に対する抵抗性メカニズムに NPF が何らかの影響を与え、これを活性化することにより得られると考えられる。しかしサツマイモの苗は扱いが困難であったため、これまで誘導抵抗に関する化学的な知見が得られていない。本章ではサツマイモに代わるモデル系の確立を試みた。サツマイモの病原である PF はソライロアサガオにも病原性を示し、葉部の黄化つまり葉緑素含量の低下を引き起こした。この症状はサツマイモつる割れ病にも見られた症状であった。また、このソライロアサガオ幼苗の葉部の黄化は、葉緑素量を指標とすることにより、定量的に評価することができた。PF 孢子懸濁液 7 日間処理によって葉部葉緑素含量は蒸留水処理区のそれに比べて約半分にまで減少した。

PF によって生ずるソライロアサガオの病徴は NPF を前処理することにより、サツマイモの場合と同様、抑制することができた。この病徴抑制効果は処理した NPF 孢子懸濁液の孢子密度が高くなるほど上昇した。 $10^4$  /ml までは抑制効果ははっきりとは見られなかったが、 $10^5$  /ml から徐々に上昇し  $10^7$  /ml ではほぼ一定となった。サ

ツマイモが NPF 孢子懸濁液を  $10^4$  /ml で処理することで防除効果が見られ始めていたことを考慮すると、抵抗性を誘導する際、ソライロアサガオは NPF に対して感受性が低いと考えられた。

PF のソライロアサガオ体内での分布を検討した。PF の検出には *Fusarium* の良い選択培地である駒田培地上で行った。蒸留水前処理の後 PF 処理を 12 日間行った幼苗より採取した部分 I-IV 全てから PF は検出された。それに対して NPF 前処理を行い PF 処理を 12 日間行ったソライロアサガオ幼苗の部分 II, III および IV からは PF および NPF はどちらも検出されなかった。NPF 前処理区の茎部 I からはコロニーが形成されているのが観察されたが、NPF と PF の区別はできなかった。以上の結果から、NPF の前処理によって 12 日後のソライロアサガオ幼苗において I と II あるいは III の間で明らかに PF の侵入が抑えられていることが明らかとなった。このことから体内での *Fusarium* の蔓延が抑制されることがうかがわれた。この抑制効果は葉部の葉緑素の減少の抑制効果と明らかに並行して生じていた。PF の子葉への侵入が抑制されることによって、葉緑素の減少が抑えられている可能性が高いと考えられた。*Fusarium* の移行を制限する効果は物理的なものか、化学的なものかについては不明である。

ソライロアサガオの NPF に対する反応は迅速で、5 秒間の NPF 処理でわずかではあるが黄化の抑制が見られた。この迅速な誘導はサツマイモでも見られている。サツマイモでも数秒の処理でわずかではあるが有意にサツマイモつる割れ病の防除効果が得られている (Ogawa, 1988)。しかしながら、この結果は必ずしも本反応が単純なオン/オフのスイッチによって制御されていることを示してはいない。なぜなら、NPF の孢子が短時間の処理でもいくらか植物の表面に残っており、これらが植物と相互作用することができるからである。

ソライロアサガオにおける病徴の抑制効果は NPF 培養液を遠心分離して菌体を除いた上澄み液でも得られた。この効果は NPF 孢子懸濁液を処理したときとほぼ同等であった。この上澄み液の誘導能はオートクレーブで熱処理をすることによって失われた。このことから、NPF の産生する病徴の抑制を誘導する因子は熱に不安定な成分であることが示唆された。しかしながらこの成分は NPF 孢子が成長してゆ

く過程で分泌されているように考えられた。なぜなら熱処理後の死菌孢子では病徴の抑制効果は誘導されなかったからである。

このソライロアサガオ幼苗の葉部葉緑素含量を指標とした検定系は PF のソライロアサガオ体内での蔓延を反映しており、簡便な誘導抵抗性の検定系として有用であると考えられた。



### 3. 非病原性 *Fusarium* によって誘導されるソライロアサガオの交叉抵抗性

#### 3-1 緒論

植物は非病原レースや弱毒性の病原菌を接種すると抵抗性を誘導することが古くから知られている。これは侵入してきた菌を植物が認識、抵抗反応を誘導し、抵抗性を獲得する現象であると考えられている。病原の認識に関わる成分として病原や宿主の細胞壁構成成分であるキトサンやグルカンなどの多糖や病原の産生するタンパク質・ペプチド、さらには二次代謝産物などが見出されている (Schottens-Toma and Wit, 1988; Doubrava et al., 1988; Pospieszny et al., 1991; Cheong and Hahn, 1991; Yamada et al., 1993; Doares et al., 1995)。これらの化合物の認識につづいて植物細胞内に何らかのシグナルが伝達され核にいたる。その結果、抵抗反応関連遺伝子の転写が活性化される (Ward et al., 1991)。この異物の認識から核に到るまでの間に作用し、抵抗反応を誘導する化合物を外部から処理すると種々の抵抗反応を引き起こすことが知られている (Kessmann et al., 1994)。特にタバコやキウリでは内因性のシグナル伝達物質であることが示されている salicylic acid (SA) (Mills and Wood, 1984; Malamy et al., 1990; Chen et al., 1995; Meuwly et al., 1995; Shulaev et al., 1997) や jasmoic acid (Creelman and Mullet, 1995; Bleichert et al., 1995; Schweizer et al., 1997; Wasternack and Parthier, 1997) は外部からの処理によっても植物に抵抗反応を引き起こす。また SA が作用する経路上に作用点を持つと考えられている 2,6-dichloroisonicotinic acid (Delaney et al., 1995; Schweizer et al., 1997) や benzo-(1,2,3)-thiadiazole-7-carbothioic acid *S*-methyl ester (BTH) (Görlach et al., 1996; Benhamou and Bélanger, 1998) も同様に抵抗反応を引き起こす。またジニトロアニリン系の除草剤にメロンやトマトの *Fusarium* 病に対する抵抗性を誘導する活性が見出されている (Bolter et al., 1993; Starratt and Lazarovits, 1996; Starratt and Lazarovits, 1999)。

また病原の侵入にともなって生ずる抵抗反応には植物ホルモンが関係していると考えられている (Sziráki et al., 1980; Whenham, 1989; Zieslin et al., 1996; Whenham et

al., 1986)。実際にこれら进行处理すると抵抗性が誘導されるという報告がなされている (Mills et al., 1986)。

本章では NPF 処理による抵抗性誘導のメカニズムに関する知見を得るため、これまでに知られている抵抗反応を活性化する薬剤、植物ホルモン、そして NPF 培養物をソライロアサガオに処理し誘導される抵抗性について比較、検討を行った。

#### 3-2 材料および方法

##### 3-2-1 処理薬剤

植物ホルモンは 6-benzyladenine (6BA, Kojin), 3-indolebutyric acid (IBA, ナカライテスク), gibberellic acid (GA, ナカライテスク) および abscisic acid (ABA, 和光純薬) を用いた。また salicylic acid (SA) と methyl jasmonate (JAMe) は和光純薬から購入した。2,6-Dichloronicotinic acid (INA) (Kunz et al., 1988) および trifluralin (TFL) (Soper, 1966) は既報の方法に従って合成したものを用いた。

##### 3-2-2 植物試料および菌体試料

植物試料および菌体試料は第2章に示した方法に従った。また NPF 培養液を 15,000×G, 20分間遠心し NPF 培養液の上澄み液を得た。またこの上澄み液もしくは培養液は必要に応じて 120 °C, 15 分間オートクレーブを行った。

##### 3-2-3 植物の処理および病徴の評価法

用いた薬剤のうち ABA, INA, JAMe および TFL は 1 % (v/v) エタノールを含む水溶液にて、また 6BA は 0.05 M KCl を含む水溶液にて処理を行った。それぞれのコントロールには 1 % (v/v) エタノール水溶液もしくは 0.05 M KCl 水溶液をそれぞれ用いた。菌体培養液から得られた試験液に対しては蒸留水をコントロールに用いた。ソライロアサガオ幼苗の切り口基部を各処理薬剤水溶液に浸漬し 25 °C 明条件下で 20 時間保持した。処理後の幼苗を PF 孢子懸濁液 (10<sup>5</sup>/ml) に移し、25 °C 明条件下



で7日間保持したのち、子葉を5 mlの80% (v/v) アセトン水溶液に浸漬し、一晚放置した。得られたアセトン抽出液の葉緑素濃度を第2章の方法に従って測定し、子葉中に含まれる葉緑素量を求めた。

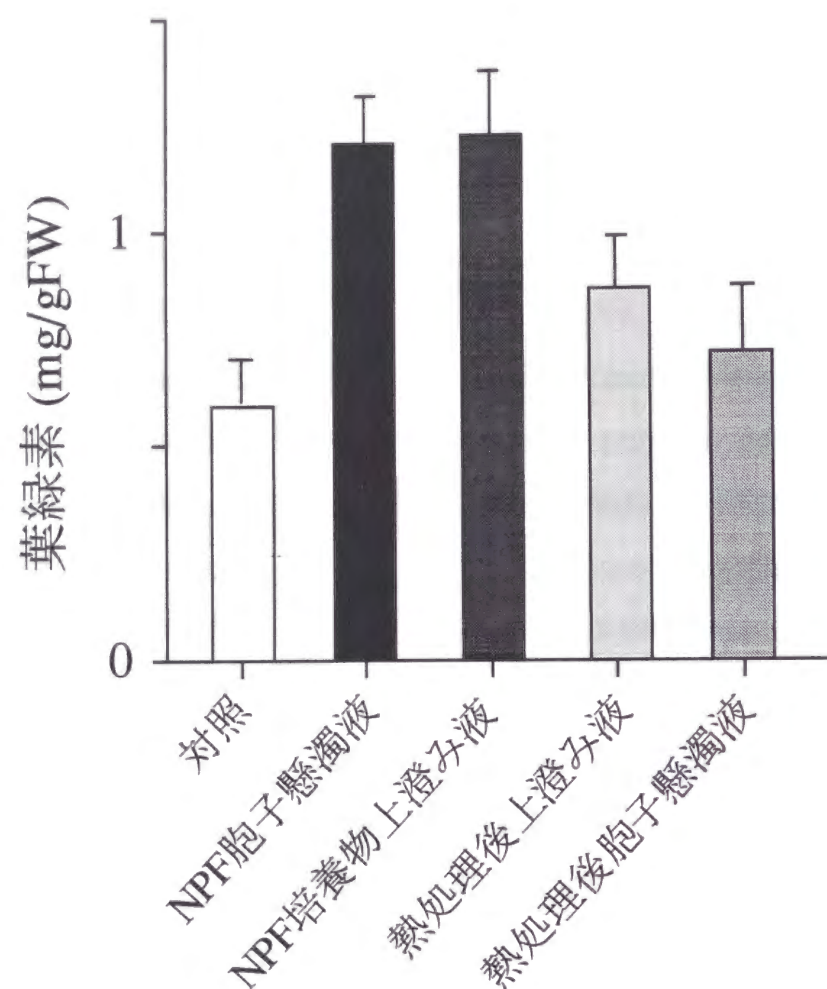


Figure 3-1 NPF培養物および、死菌体による抵抗性誘導。

ソライロアサガオ幼苗をそれぞれの処理液に20時間浸漬した後、PF処理 ( $10^5$  bud-cells/ml) を行った。

### 3-3 結果

#### 3-3-1 菌体培養液による抵抗性誘導

NPF 7日間振盪培養液を遠心し菌体を除いた上澄み液の効果を NPF 胞子と比較した。その結果上澄み液を前処理したソライロアサガオの葉部に、PFによる葉緑素含量減少に対する抑制効果が見られた。この効果は NPF 胞子懸濁液 ( $10^8$ /ml) とほぼ同等であった (Figure 3-1)。しかしながら上澄み液をオートクレーブにて熱処理をすると抑制効果が失われた。すなわちオートクレーブ後の上澄み液を前処理したソライロアサガオ幼苗子葉の葉緑素含量は PF 処理によって、7日後において蒸留水前処理区とほぼ同じ程度まで減少した。またオートクレーブによって熱処理した胞子懸濁液にも葉緑素含量の減少の抑制効果は見られなかった。熱処理後の胞子懸濁液を前処理したソライロアサガオの葉部の葉緑素含量は PF 処理によって減少した。

#### 3-3-2 植物ホルモンの病徴に与える影響

ソライロアサガオ幼苗にオーキシシン (IBA) を  $110 - 0.1 \mu\text{M}$ , ジベレリン (GA) を  $110 - 0.1 \mu\text{M}$ , サイトカイニン (6BA) を  $950 - 1 \mu\text{M}$  として abscisic acid (ABA) を  $230 - 2.3 \mu\text{M}$  の濃度でそれぞれ20時間、前処理した後、PF 胞子懸濁液 ( $10^5$ /ml) を7日間処理した (Table 3-1)。IBA  $110 \mu\text{M}$  前処理区の茎部には著しい屈曲が見られ、PF 処理開始後3日で枯死した。IBA, GA および 6BA 前処理区では PF 処理による葉緑素含量の現象に対して抑制効果は見られなかった。一方、ABA 前処理区では葉緑素含量減少の抑制効果が見られた。NPF 胞子懸濁液を  $10^8$ /ml で前処理した時を 100%, 蒸留水前処理を 0% としたとき、この ABA による減少に対する抑制効果は  $23 \mu\text{M}$  の処理濃度で 56% であった。



Table 3-1 植物ホルモンが葉緑素減少に与える影響

		薬剂処理				
処理薬剂	対照	濃度 (μM)				
		110	11	1.1	0.1	
IBA	蒸留水	0.58 (0.02)	0.65 (0.08)	0.43 (0.05)	0.56 (0.06)	0.49 (0.02)
	NPF	0.93 (0.09)				
6BA <sup>a)</sup>	蒸留水	0.41 (0.08)	0.43 (0.06)	0.35 (0.02)	0.29 (0.01)	0.41 (0.04)
	NPF	0.79 (0.09)				
GA	蒸留水	0.58 (0.02)	0.42 (0.04)	0.56 (0.04)	0.43 (0.03)	0.40 (0.02)
	NPF	0.93 (0.09)				
ABA <sup>b)</sup>	蒸留水	0.61 (0.06)	0.75 (0.09)	1.0 (0.05)	0.75 (0.06)	
	NPF	1.3 (0.15)				

それぞれの数値は薬剤処理を前処理した後、PF処理を7日間行った幼苗の子葉中に含まれる葉緑素量 [mg/gFW, (SE, n=3)] を表している。NPFは孢子密度  $10^8$  /ml にて行った。

a) 0.05 M KCl を含む

b) 1 % (v/v) ethanol を含む

### 3-3-3 抵抗性誘導薬剤処理による抵抗性誘導

現在、植物の抵抗反応誘導機構を活性化し、病害に対する抵抗性を植物に付与する活性を有する薬剤が知られている。それらの中で、SA, JAMe, INA および TFL について、ソライロアサガオを用いた検定系において NPF の効果と比較した。それぞれの薬剤は 20 時間、前処理を行った。PF 処理 7 日後において SA, JAMe および INA に葉緑素減少抑制効果は見られなかったが、TFL 前処理区のソライロアサガオ葉部は NPF 前処理区 ( $10^8$ /ml) のその約 70 % の葉緑素を保持していた。その結果を Table 3-2 に示した。

Table 3-2 植物抵抗性活性化薬剤が葉緑素減少に与える影響

処理薬剤	対照	薬剤処理				
		濃度 (μM)				
SA	蒸留水	0.43 (0.04)	1000	100	10	1
	NPF	1.2 (0.16)	0.49 (0.14)	0.40 (0.05)	0.35 (0.03)	0.33 (0.04)
INA <sup>a)</sup>	蒸留水	0.43 (0.05)	67	6.7	0.7	
	NPF	0.91 (0.02)	0.47 (0.03)	0.57 (0.08)	0.48 (0.08)	
JAMe <sup>a)</sup>	蒸留水	0.84 (0.09)	45	4.5		
	NPF	1.2 (0.11)	0.67 (0.05)	0.82 (0.02)		
TFL <sup>a)</sup>	蒸留水	0.61 (0.06)	310	31	3.1	
	NPF	1.3 (0.15)	1.0 (0.07)	1.1 (0.08)	0.83 (0.17)	

それぞれの数値は薬剤処理を前処理した後、PF処理を7日間行った幼苗の子葉中に含まれる葉緑素量 [mg/gFW, (SE, n=3)] を表している。NPFは孢子密度  $10^8$  /ml にて行った。

a) 1 % (v/v) ethanol を含む

### 3-4 考察

ソライロアサガオ幼苗の病徴の抑制効果は、NPF 培養液を遠心して得られた上澄み液の前処理によっても得られた。またその効果は NPF 孢子懸濁液処理とほぼ同等であった。この抑制効果は上澄み液を熱処理すると失われた。このことから、NPF の有する抵抗性誘導因子は熱に不安定な性質を有していることが明らかとなった。熱処理後の孢子懸濁液もこの抑制効果を失ったことから、抵抗性誘導に関わる因子は孢子が大量に植物組織に付着することによる物理的な刺激によるのではなく、NPF が産生する化学物質であることが示唆された。現在種々の植物で抵抗性を誘導する成分が微生物の構成成分、もしくは分泌物から単離されている。NPF に関してこのような抵抗性誘導因子が存在しているものと考えられる。

サイトカイニンをタバコに処理すると、タバコモザイクウイルスに対して抵抗



性を誘導するなど、植物ホルモンが抵抗性を誘導するという報告がこれまでになされている (Mills et al., 1986; Zieslin et al., 1996; Sziráki et al., 1980; Whenham et al., 1986; Whenham, 1989). 本研究で用いた植物ホルモンの中で、PF処理による葉緑素含量の減少に対して抑制効果を示したのは ABA であった。ABA についてはタバコに外部から与えたとき、葉部の葉緑素含量を上昇させる活性があり、その結果タバコモザイクウイルスに対する抵抗性を誘導するとの報告がある (Whenham et al., 1986). ソライロアサガオの場合においてもABAは葉部の葉緑素含量に何らかの効果を発揮し、その結果、PF処理による葉緑素の減少を抑えているのかもしれない。したがって、NPF 処理後の植物体内でのABA含量の変化の追跡、および NPF 代謝産物中のABA活性を示す成分の検索が必要である。

近年、植物生理学や植物病理学分野において、植物の抵抗反応誘導が内因性の化学物質によって制御されているということが示されている。この内因性物質として SA (Malamy et al., 1990; Delaney et al., 1994; Ryals et al., 1995) と jasmonic acid (Cohen et al., 1993; Bleichert et al., 1995; Creelman and Mullet, 1995) が報告され、タバコやキウリでこれら成分に応答性のシグナル伝達系路の存在が示唆されている。しかしながら、これらの薬剤と今回ソライロアサガオに見られた病徴の抑制効果との関連性は疑わしいと思われる。なぜならば、SA 前処理もしくは jasmonate の類縁体である JAMe 前処理によっても抑制効果が見られなかったからである。また SA 依存性の病害抵抗反応誘導に関わるシグナル伝達経路を活性化することができると考えられている INA (Ward et al., 1991; Kessmann et al., 1994; Siegrist et al., 1994; Schweizer et al., 1997) もソライロアサガオにおいては抵抗性を誘導しなかった。その一方で、ジニトロアニリン系の除草剤である TFL はPFによる葉部の黄化を抑える効果を示した。TFL がトマトやメロンにおいて *Fusarium* による病害に対する抵抗性を誘導したという報告がある (Starratt and Lazarovits, 1996; Starratt and Lazarovits, 1999). しかしながらその抵抗性誘導のメカニズムは現在不明である。TFL の植物に対する作用をさらに研究することにより、NPF の誘導する抵抗性のメカニズムに関する知見が得られるかもしれない。

#### 4. 交叉抵抗性の発現にともなう植物の二次代謝変化

##### 4-1 結論

植物は病原を異物として認識し、各種の抵抗反応を活性化し、侵入者の表面に存在している chitin や glucan の断片、植物組織を構成している pectin 断片などを手がかりに植物は侵入者を認識すると考えられている (Cheong et al., 1991; Yamada et al., 1993; Knogge, 1996). また抵抗反応としては、抗菌活性を有したファイトアレキシンの蓄積 (Bailey and Mansfield, 1982) や細胞壁のリグニン化 (Keller et al., 1996; Ralph et al., 1998) などが挙げられる。またフェニルプロパノイド生合成経路などの二次代謝の活性化 (Ni et al., 1996; 山田 他, 1997) も生ずることが知られている。これらの反応が適切に誘導されることにより、病原の体内での増殖が抑制された状態が抵抗性獲得状態であると考えられる。

NPF によって誘導されるサツマイモの抵抗性は圃場レベルで高い防除効果を示すにも関わらず、その作用機作に関する化学的、植物生理学的知見は得られていない。本研究で確立したソライロアサガオを用いた抵抗性の検定系では、植物試料が市販の種から簡便に得られることから、誘導因子の解析など生化学的分析において高い再現性を期待することができる。

このソライロアサガオに誘導される抵抗性に関して、迅速に抵抗性が獲得されているのかを判断する有効な方法がない。つまり処理が有効であったか否かを生物検定によって判断するには7日かそれ以上の日数を要する。このように時間のかかる実験系ではNPFもしくはソライロアサガオ、そしてPFが有する多くの成分のうちで、どれが抵抗性誘導に関わる因子なのかを判断する際に大きな障害となる。さらにこの数時間以内のうちで植物体内のどの反応が抵抗性誘導に重要なのかを判断する際にも、このように時間のかかる生物検定法は適さない。本現象における抵抗性誘導機構の詳細を明らかにするためには、菌と植物の相互作用の後、抵抗性が獲得されるまでの数時間の間に生ずる植物の反応を解析することが重要である。また



抵抗性誘導に際して重要な反応を見出しこれを指標とすることが必要であると考えられる。

そこで本章では、このような相互作用および抵抗性獲得に関連したマーカーの探索を目的として、菌処理後のソライロアサガオ組織内に生ずる代謝変化を検討した。とくにフェニルプロパノイド生合成経路に着目し、その初段階を触媒する phenylalanine ammonia-lyase の変動およびフェノール性化合物の組成変化の分析を行った。

## 4-2 材料および方法

### 4-2-1 菌体材料および植物材料

植物試料および菌体試料は第2章に示した方法に従った。また NPF 培養液を 15,000×G で 20 分間遠心し NPF 培養液の上澄み液を得た。またこの上澄み液もしくは培養液は必要に応じて 120 °C、15 分間オートクレーブを行った。

### 4-2-2 Phenylalanine ammonia-lyase (PAL) [EC 4.3.1.5] の抽出および活性測定

ソライロアサガオ幼苗を基部（切り口基部より 2.5 cm を茎下部、残りの部分を茎上部とした。各約 0.13 g FW）および子葉（約 0.16g FW）にカミソリにて切り、それぞれを 50 mM Tris-HCl 緩衝液 [pH 8.4, 0.1 % (v/v) 2-mercaptoethanolを含む] 1 ml 中で海砂とともに氷冷下で乳鉢で磨砕した。抽出液を 15,000×G、10 分間、4°C にて遠心した後、上澄みを酵素液として用いた。酵素液（100 μl）を 100 μl の 100 mM Tris-HCl 緩衝液（pH 8.4, 10 mM L-phenylalanineを含む）に加え、30°C で 30 分間保持したのちに酢酸 50 μl を加え反応を停止した。この反応液 10 μl を逆相高速液体クロマトグラフィーにて分析した。移動相は 60% (v/v) メタノール水溶液（流速 0.8 ml/min）、カラム COSMOSIL 5C18-AR II（150 × 4.6 mm I.D.）を用いた。検出は UV（280nm）にて行い生成した *trans*-cinnamate を検出、定量した。反応に用いたタンパク量の定量は Bio Rad protein assay kit を用いて行った。PAL は反応液に加えたタン

パク質量あたりの活性値として表した。

### 4-2-3 変動成分の検索

NPF 胞子懸濁液で 2 日間処理した幼苗基部切り口基部より（2.5 cm×各 5 本）を 80 % (v/v) メタノール水溶液 2 ml とともにガラスホモジナイザーで磨砕した。磨砕液を 3,000×G で 10 分間遠心した。上澄み液をあらかじめ蒸留水で平衡化した Sep-Pak® C18（Millipore）に注入した後カートリッジをメタノール 2 ml で溶出した。溶出液を窒素気流により溶媒を除いた後、残渣に 80 % (v/v) メタノール水溶液 500 μl を加え分析試料とした。分析は逆相液体クロマトグラフィーにて行った。20% (v/v) メタノール水溶液 [0.1% (v/v) ギ酸を含む] で平衡化したカラム YMC-pak ODS-A（150×4.6mm I.D.）に試料 10 μl を注入した後、移動相の流速を 0.8 ml/min に保ち、グラディエント溶出法にて溶出させた（島津製作所 LC-10AS 型ポンプ 2 台）。グラディエントプログラムは以下に述べるとおりである。開始後 2 分間は、20 % メタノールに保ち、その後 1.2 % /min で 27 分で 50 % にまでメタノール含量を上昇させた。次に 29 分で 100 % メタノールとしその後 7 分間そのまま維持したのち、20 % メタノールに戻した（全 37 分間/1 試料）。カラム温度は 35 °C に保ち、ピークの検出は UV 254 nm にて行った。

### 4-2-4 Scopolin（成分 4-A）の分取

ソライロアサガオ幼苗基部切り口基部を NPF 胞子懸濁液（10<sup>8</sup>/ml）に浸漬し 25 °C、明条件下で 20 時間保持した。これを蒸留水に移しさらに 28 時間保持した。処理後の幼苗（120 g FW）を 300 ml の 80 % (v/v) メタノール水溶液とともにメカニカルホモジナイザー（AM-7 homogenizer, 日本精機製）で破砕し、得られた破砕液を 3,000×G で 10 分間遠心した。この上澄み液を減圧濃縮し 50 % (v/v) メタノール水溶液 2 ml に溶解した。この溶液を、前もって蒸留水で充填した Sep-Pak® C18 カートリッジに注入し 50 % (v/v) メタノール水溶液 5 ml で溶出した。溶出液を減圧濃縮した後、分取-逆相高速液体クロマトグラフィーを用いて分離した。移動相は 15 % (v/v) メタノール水溶液 [0.1 % (v/v) ギ酸を含む] とし、カラムは COSMOSIL



5C18-AR (250 × 20 mm I.D.) を用いた。溶出ピークの検出は UV 254 nm にて行った。目的の画分を分取し scopolin (成分 4-A) 5.3 mg を得た。

#### 4-2-5 Scopolin の同定

成分 4-A の  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ -核磁気共鳴 (nuclear magnetic resonance : NMR) スペクトルはそれぞれ 300, 75 MHz で BRUKER AC-300 にて測定した。H-H COSY (H-H correlation spectroscopy), HMQC ( $^1\text{H}$ -detected multiple quantum coherence spectrum) および HMBC ( $^1\text{H}$ -detected multiple-bond heteronuclear multiple quantum coherence spectrum) スペクトルは BRUKER ARX-500 にて測定した。質量分析は Perkin-Elmer Sciex API 165 にて大気圧イオン化法を用いて測定した。UV スペクトルは島津製作所 UV-1600 PC 型スペクトロメーターにて測定した。

生成後の成分の水酸基の数の決定のためピリジン/無水酢酸によるアセチル化を行った。成分 4-A 5.0 mg を無水ピリジン 1 ml に溶解し、これに無水酢酸 1 ml を加え一晩室温にて放置した。反応を薄層クロマトグラフィー (Merck DC-Alufolien Kieselgel 60 F<sub>254</sub>) 上で展開液ヘキサン/酢酸エチル/メタノール (400:400:1) をもちいて追跡した。反応終了後、メタノール 10 ml を加え、減圧条件下で溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラム (1 g; Wako gel, 和光純薬) にチャージし混合溶媒ヘキサン/酢酸エチル/メタノール (400:400:1) にて溶出した。得られた画分を濃縮しアセチル化物 6.6 mg を得た。(収率 93 %)

糖部分は以下に述べる cGC 分析によって決定した。成分 4-A (3 mg) を 1 N 塩酸 2 ml に溶解し 85 °C で 2 時間攪拌した。反応の進行は薄層クロマトグラフィー上で反応液を酢酸エチル/メタノール混合溶媒 (混合比 2:1) にて展開し追跡した。その後反応液を減圧濃縮し、得られた残渣を蒸留水 1 ml に溶解し、前もって 0.1 % (v/v) ギ酸水溶液で充填した Sep-Pak® C18 カートリッジにチャージした。このカートリッジを 0.1 % (v/v) ギ酸水溶液 6 ml で溶出し、酸加水分解物の極性画分を得た。次にカートリッジをメタノール 6 ml で溶出し低極性画分を得た。この低極性画分は溶媒を留去した後 chloroform-*d* 中に溶解し NMR サンプルとした。また極性画分から完全に溶媒を留去、乾固したのち、残渣にトリメチルシリル化試薬 (dry pyridine :

trimethylchlorosilane : hexamethyldisilazane = 10 : 1 : 2, v/v/v) 1 ml を加え、超音波処理を数秒間行い溶解させた。反応液を 15 分放置した後、その 1  $\mu\text{l}$  を cGC 分析に供試した。分析にはキャピラリーカラム Quadrex® MS (25 m × 0.25 mm I.D., 0.25  $\mu\text{m}$  film thickness) を用い、検出は FID 法で行った。キャリアーガスはヘリウムガスを用いた (線速度 28.1 cm/min)。注入部および検出器の温度はそれぞれ 180 °C に保った。オーブン温度は開始温度 160 °C から 1 °C/min で 180 °C まで上昇させた (全 20 分)。同様に和光純薬より購入した D-glucose (1.2mg), D-fructose (3.2mg), D-galactose (5.8mg) および L-rhamnose (3.4mg) をそれぞれトリメチルシリル化試薬 1 ml にて反応させ糖標品として分析に用いた (4-3-3 参照)。

#### 4-2-6 Scopoletin および scopolin の定量

採取したソライロアサガオ幼苗の切り口基部を NPF 孢子懸濁液 ( $10^3$ – $10^8$ /ml) に浸漬し、25 °C, 明条件下で保持した。この幼苗の茎部 (切り口基部より 2.5 cm を茎下部, 残りの部分を茎上部とした) および子葉をそれぞれ 2 ml の 10 % (v/v) アセトニトリル水溶液 (2 % 酢酸を含む) とともにプラスチック密閉容器中, 沸騰湯浴 (10 分間) により抽出した。得られた抽出液が室温になるまで放置し, 3,000 × G, 10 分間遠心し上澄み液を分析に供試した。分析は逆相高速液体クロマトグラフィーにて行った。15 % (v/v) メタノール水溶液 [0.1 % (v/v) ギ酸を含む] で 35 °C に平衡化した YMC-pak ODS-A (150 × 4.6 mm I.D.) に分析サンプル 20  $\mu\text{l}$  を注入した。移動相の送液は日立 L-7100 型ポンプ 2 台を用いてグラディエント溶出法で行った。メタノール始発濃度 15 % を 2 分間保った後, 2 %/min で移動相中のメタノール比を上昇させ, 開始後 20 分で 37.8 % まで上昇させた。次に 21 分後にメタノールが 100 % になるように上昇させカラムの洗浄を行った。洗浄を 2 分間行った後 15 % メタノールに再び戻した (全 25 分間/1 試料)。移動相の流速は 0.75 ml/min に保った。ピークは蛍光検出 (励起波長 340 nm, 蛍光検出波長 420 nm, 日立 L-7480 型蛍光検出器) にて行った。



#### 4-2-7 Scopoletin と scopolin の抗菌活性

Scopoletin および scopolin について抗 PF 活性を 2 通りの方法で検定した。まず PF 菌の生育阻害活性の測定を行った。Scopoletin もしくは scopolin のメタノール溶液を抗生物質検定用濾紙（薄型，8 mm I.D. 東洋濾紙）にそれぞれ 1-100  $\mu\text{g}$  になるよう吸収させた。これを風乾させた後，PF 孢子（ $10^6/\text{ml}$ ，9 cm プラスチックシャーレ）を含む PSA 培地上に置き，25  $^{\circ}\text{C}$  暗所で 20 時間放置した。この濾紙のまわりの阻止円を観察した。

次に，孢子の発芽阻害について検定した。1 % (v/v) エタノールおよび 1 % (w/v) ショ糖を含む scopoletin もしくは scopolin 水溶液（0.1, 0.01 mg/ml）に PF 孢子を懸濁（ $10^5/\text{ml}$ ）し 25  $^{\circ}\text{C}$ ，暗所で 24 時間振盪（130 rpm）した。光学顕微鏡にて孢子の発芽を観察し，発芽率を決定した。コントロールには 1 % (v/v) エタノールおよび 1 % (w/v) ショ糖水溶液を用いた。

#### 4-2-8 Scopoletin と scopolin の抵抗性誘導活性

Scopoletin もしくは scopolin を前処理したソライロアサガオ幼苗における PF 抵抗性を検定した。1 % (v/v) エタノールを含む scopoletin もしくは scopolin 水溶液（0.1-10 ppm）にソライロアサガオ幼苗の切り口基部を浸漬し 20 時間，25  $^{\circ}\text{C}$ ，明条件下で保持した。この幼苗を PF 孢子懸濁液（ $10^5/\text{ml}$ ，0.05 % HYPONEX<sup>®</sup>を含む）に移し，さらに 25  $^{\circ}\text{C}$ ，明条件下で 7 日間保持した後，子葉を 5 ml の 80 % (v/v) アセトン水溶液に浸漬し一晩放置した。得られた抽出液の吸光度（645 および 663 nm）を測定し，第 2 章の方法に従って子葉に含まれる葉緑素量を算出した。

### 4-3 結果

#### 4-3-1 PAL 活性の変動

幼苗の PAL 活性を経時的に追跡した。その結果を Figure 4-1 に示した。茎下部の PAL 活性は蒸留水処理区で徐々に上昇し，34 時間後に最大値を示した。

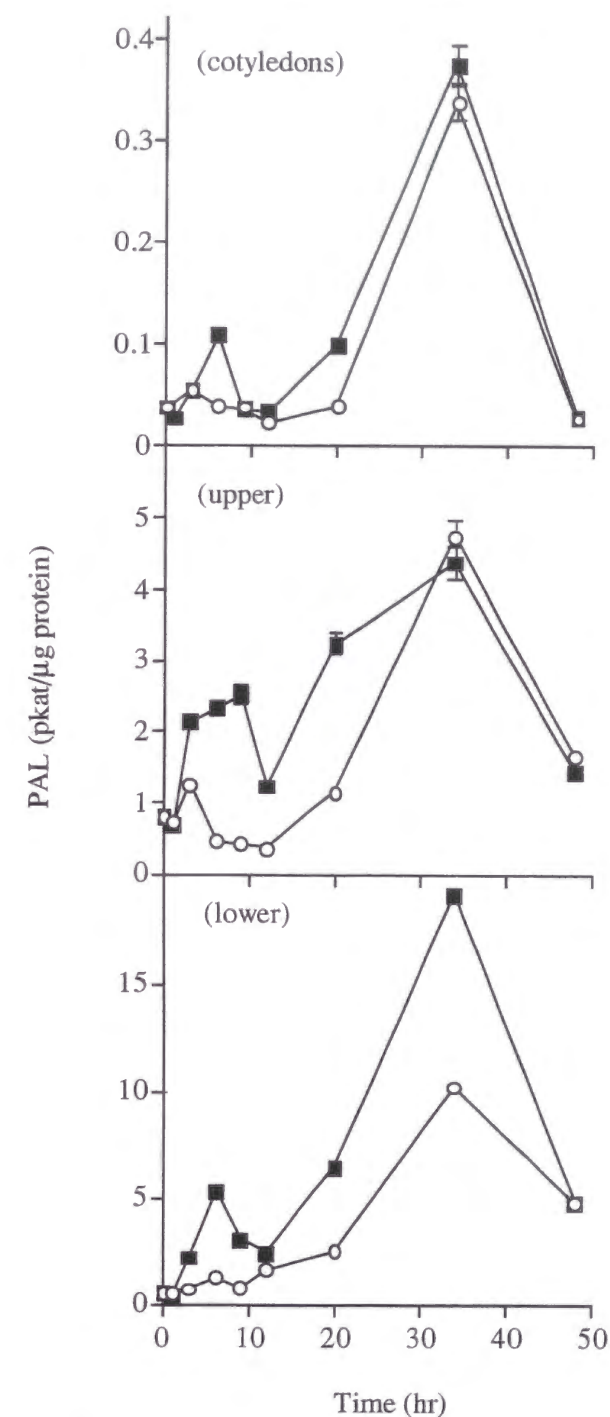


Figure 4-1 処理後の PAL 活性の変動。

ソライロアサガオの子葉（上），茎上部（中央），茎下部（下）それぞれの部位の活性を示した。○は蒸留水 20 時間前処理区，■は NPF（ $10^8$  孢子/ml）20 時間前処理区の PAL 活性を示している。ソライロアサガオ幼苗は，それぞれの前処理の後，蒸留水に移植した。

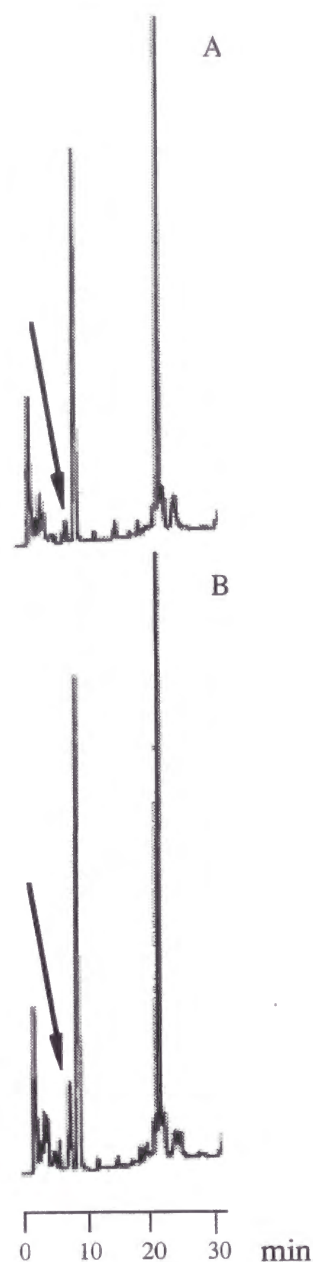


Figure 4-2 変動成分の検索.

2に置換処理の後のソライロアサガオ幼苗の基部 10% アセトニトリル水溶液 (含 2% 酢酸) を逆相 HPLC にて分析した (検出波長 254 nm). 矢印は変動の見られた成分を示している. A: 水処理区, B: NPF 処理区.

これに対し, NPF 処理区の茎下部では蒸留水処理区に比べて活性の上昇開始が早く, 6 時間後で蒸留水処理区の 3 倍の PAL 活性を示した. PAL 活性は NPF 処理区でも 34 時間で最大値を示した. 茎上部および子葉においても絶対値は小さいものの茎下部と同様の挙動を示した. 茎上部では処理後 20 時間までは NPF 処理区が蒸留水処理区に比べて高い値を示していたが 34 時間後にはほぼ同等の活性となった. 子葉では処理後 6 時間までは NPF 処理区が高い値を示していたがそれ以後大きな差は見られなかった.

#### 4-3-2 変動成分の検索

幼苗基部抽出物中で含量が変化する成分を検索した. その結果, Figure 4-2 に示した 8.3 分に溶出する成分 4-A が NPF 処理によって 2 日後にその含量が変化することが見出された. 尚, 成分 4-A は NPF からは検出されなかった (データは示していない).

#### 4-3-3 変動成分の構造決定

分取後の成分 4-A の UV スペクトルを測定したところ 340 (3.96), 291 (3.79) および 227 (4.21) nm に極大吸収 (カッコ内は log モル吸光係数) を示した (Figure 4-3).

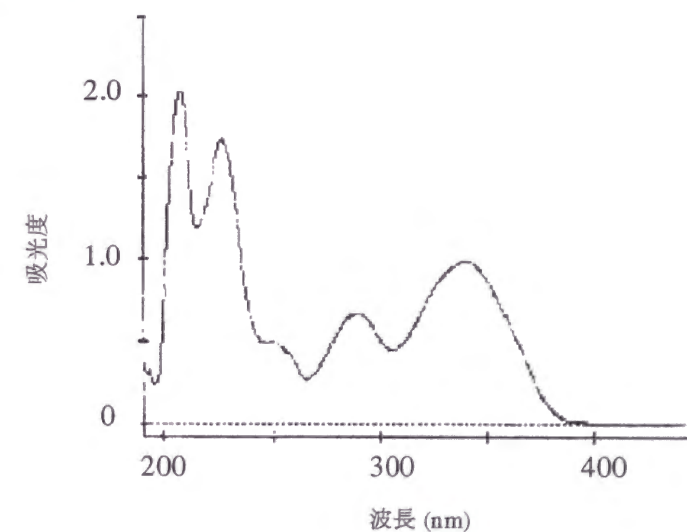


Figure 4-3 成分 4-A の UV スペクトル



成分 4-A は大気圧イオン化法質量分析の結果,  $m/z$  355  $[M+H]^+$ , 377  $[M+Na]^+$  の擬分子イオンを示し, これに基づいて分子量 354 と決定した. また  $m/z$  193 に強いフラグメントピークが観測された. このフラグメントイオンの分子イオンピークからの差,  $355-193=162$  は 6 炭糖に特徴的で, 本成分が配糖体であると予想された. また  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトルで 16 の炭素のシグナルが観測され, これらの炭素はそれぞれ DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer) 測定結果より 1 級および 2 級炭素がそれぞれ 1 つずつ, 3 級炭素が 9 つ, 4 級炭素が 5 つにそれぞれ帰属された. 4 級炭素のうち 1 つはその化学シフトからカルボニル炭素であると思われた. 分子量とこれらの結果から分子式を  $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_9$  (不飽和度 8) と推定した. また成分 4-A アセチル化物の  $^1\text{H}$ -NMR スペクトルからアセチルメチル基が 4 つ観測されたことから成分 4-A には水酸基は 4 つ存在すると考えられた. 以上にて水素シグナル 18 個分全てが帰属された. この結果を Table 4-1 に示した. 4-6 ppm および 60-100 ppm 付近に観測されたそれぞれの水素および炭素のシグナルは 6 炭糖に特徴的なシグナルであった. そのうち水素 5.79 ppm およびそれに結合している炭素 101.8 ppm のシグナルはそれぞれ 6 炭糖におけるアノメリック水素および炭素の存在を示していた. したがって質量分析の結果とあわせて考えた結果, 成分 4-A は配糖体であると考えられた. また糖部分以外の水素についての化学シフトおよび結合定数から 1,3,4,6-4 置換芳香環および *cis* 配置 2 置換エチレン骨格があると予想された. また HMBC の結果から, この *cis* 配置エチレン骨格上の 2 つの水素のうち一方 (7.67 ppm) が芳香環上の 2 つの炭素 (110.0, 113.0 ppm) およびカルボニル炭素 (161.0 ppm) と相関が見られた. もう一方の水素 (6.34 ppm) についても芳香環上の炭素 (113 ppm) およびカルボニル炭素 (161.1 ppm) との相関が観測された. したがって, この *cis* 配置エチレン骨格は芳香環およびカルボニル基にそれぞれその両端が結合していると考えられた. 4 つの芳香族性 4 級炭素うち 3 つは  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトルで 150 ppm 周辺に観測されたことから酸素が直接芳香環に結合しているものと考えられた. またさらに  $^1\text{H}$ -NMR スペクトル上で 3.74 ppm に観測されたシグナルはその化学シフトとプロトンの数からメトキシ基であると考えられた. このメトキシ基の炭素は HMBC 上

Table 4-1 Scopolin の化学シフト (ppm in pyridine- $d_5$ )

Carbon (75 MHz)		Proton (300 MHz)	
Sugar	Aglycon	Sugar	Aglycon
	161.1		
	151.2		
	150.1		
	147.0		
	143.7		7.67 d ( $J=9.5$ ) <sup>a)</sup>
	114.1		6.34 d ( $J=9.5$ )
	113.0		
	110.0		7.04 s
	104.2		7.51 s
101.8		5.79 d ( $J=7.0$ )	
		5.03 broad (hydroxy groups)	
79.1		4.19 ddd ( $J=9.6, 5.0, 2.1$ )	
78.5		4.40 dd ( $J=7.0, 6.3$ )	
74.7		4.42 dd ( $J=8.5, 6.3$ )	
71.1		4.35 dd ( $J=9.6, 8.5$ )	
62.3		4.55 dd ( $J=12.0, 2.1$ )	4.41 dd ( $J=12.0, 5.0$ )
	56.2		3.74 s

a) 結合定数 ( $J$ ; Hz)

で芳香族性 4 級炭素 (147.0 ppm) の一つと強い相関ピークが見られたことから, この芳香環はメトキシ基を有することが予想された.

ここで芳香環上の置換位置を決定するため, 核オーバーハウザー効果 (nuclear Overhauser effect : NOE) を測定した. 芳香環上の水素 (7.04 ppm) に照射した結果, 7.67 ppm の水素に 7.5 % の NOE が観測された. 同様に 7.51 ppm の水素に照射したところ 5.79 ppm に, 逆に 5.79 ppm の水素に照射すると 7.51 ppm にそれぞれ 5.2 % および 9.4 % の NOE を観測した. また 3.74 ppm のメトキシ水素に照射したところ

7.67 ppm の水素に 9.3 % の NOE が観測された。これらの結果と本化合物の不飽和度が 8 であったことを考慮すると、161.1 ppm のカルボニル基と芳香環をエステル結合でつなぐラクトン環を有する構造を持つアグリコンと、これに結合した何らかの糖が存在する構造が妥当であると考えられた。アグリコンはクマリン骨格を有する scopoletin であると推定した (Figure 4-4)。さらに質量分析スペクトルで見られた  $m/z$  193 のイオンはこのアグリコンの存在を支持していた。

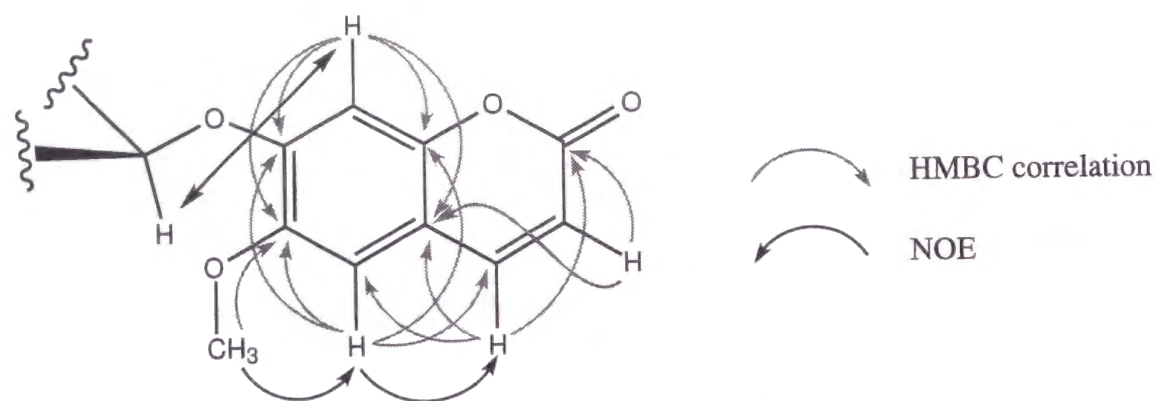


Figure 4-4 アグリコン部分のHMBC相関およびNOE

酸加水分解によって得たアグリコン部分の  $^1\text{H-NMR}$  スペクトルは標品 scopoletin (II) と一致した。また糖部分はトリメチルシリル化物のガスクロマトグラフィーの分析の結果、グルコースと決定した。グルコースとアグリコンの結合様式はアノメリック水素の結合定数が 7.0 Hz であったことから  $\beta$  型であると推測した。以上の結果から成分 4-A は scopolin (6-methoxy 7- $O$ - $\beta$ -glucopyranosyl coumarin, I) と推測した。

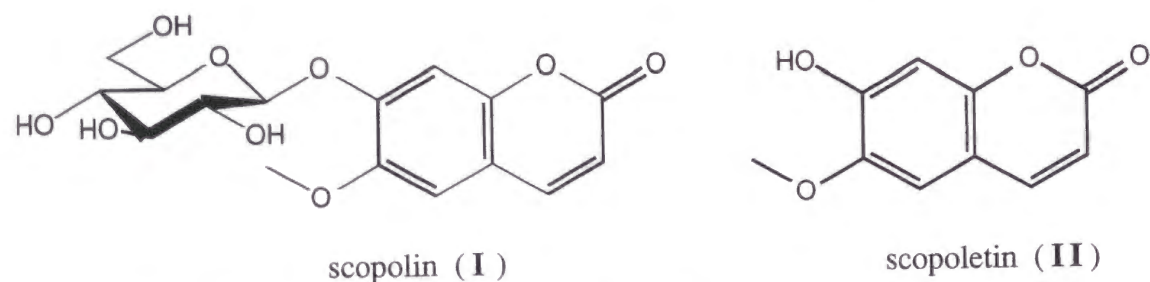


Figure 4-5 NPF 処理によって含量に変動の見られた成分

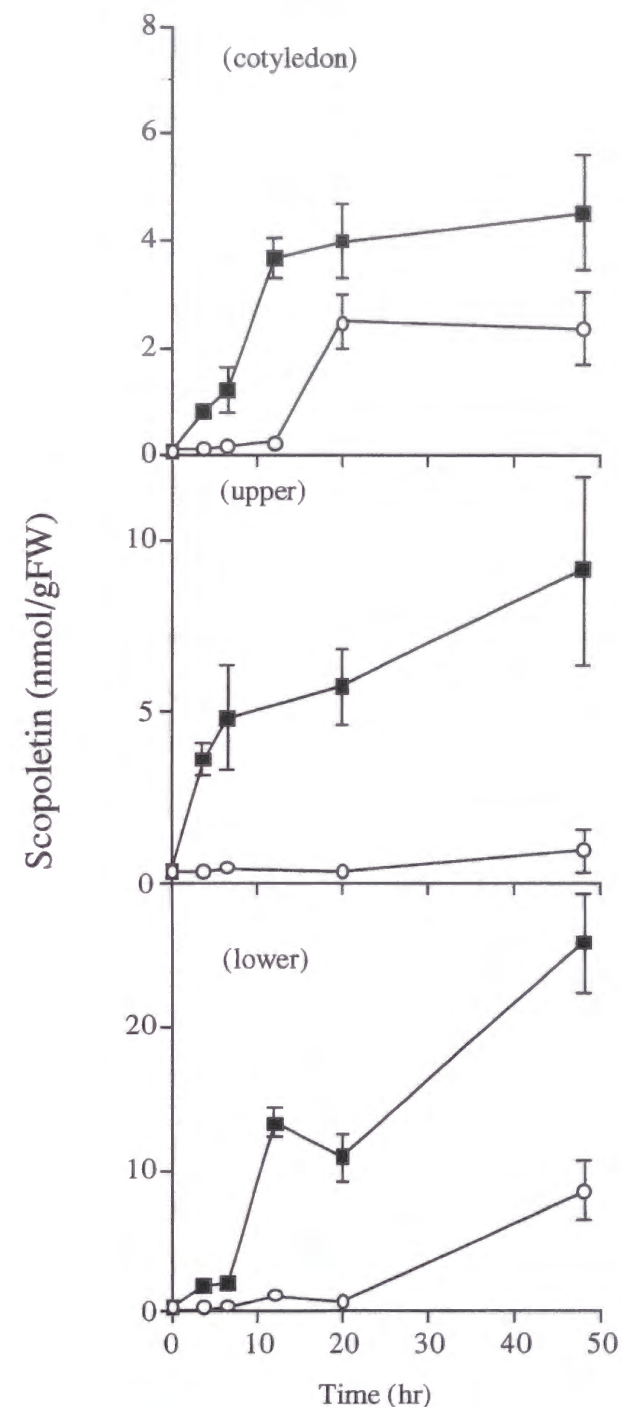


Figure 4-6 処理後ソライロアサガオ組織内の scopoletin 含量の変動。子葉 (上), 茎上部 (中央), 茎下部 (下) それぞれの部位の含量を示した。○は蒸留水 20 時間前処理区, ■は NPF ( $10^8$  孢子/ml) 20 時間前処理区である。幼苗はそれぞれの前処理の後蒸留水に移植した。



#### 4-4-4 Scopoletinおよびscopolinの変動

Scopoletin および scopolin の含量は茎下部が最も大きく、次に茎上部、子葉の順であった。すなわち scopoletin の処理前の各組織中の含量は茎下部、茎上部、子葉でそれぞれ 0.44, 0.43, 0.11 nmol/g FW であった。また scopolin はそれぞれの組織に 0.08, 2.21, 0.59 nmol/g FW 含まれていた。NPF 処理後, scopoletin 含量は全身 (全組織) で上昇した (Figure 4-6)。茎下部の scopoletin 含量は NPF 処理後 3 時間で上昇し始め, 6 から 12 時間の間に急激に増加した。これに対して蒸留水処理区では処理後 20 時間で上昇し始めたがその大きさはわずかであった。Scopolin の含量に関しても, NPF 処理区で蒸留水処理区に比べて上昇が早く, 処理後 6 時間で蓄積が始まった。また 20 時間で蒸留水処理区の約 12 倍であった (Figure 4-7)。NPF 処理区における scopolin 含量はその後, 測定時間内で上昇し続けた。蒸留水処理区では scopolin 含量は 20 時間後から徐々に上昇し始めた。また同様の反応が茎上部および子葉でも見られた。

PF 孢子懸濁液を  $10^5/\text{ml}$  にて 20 時間処理を行ったソライロアサガオ幼苗の茎下部では蒸留水処理区に比べて大きな scopoletin および scopolin の蓄積が見られた。これは NPF 孢子を  $10^5/\text{ml}$  で処理を行ったときと同等の蓄積量であった (Table 4-2)。一方, 子葉や茎に激しい萎れが生じる PF  $10^8/\text{ml}$  で処理を行ったとき, 茎下部の scopolin の蓄積量は, 蒸留水処理区よりも低い値を示した。

NPF 培養濾液から得た上澄み液処理後 20 時間の茎下部に scopoletin 含量の上昇が見られた。これは NPF 孢子懸濁液 ( $10^8/\text{ml}$ ) とほぼ同等の蓄積量であった (Figure 4-8)。しかし, この上澄み液の scopoletin 誘導活性はオートクレーブによる熱処理によって消失した。また同様に, オートクレーブ後の NPF 死菌孢子も scopoletin を誘導しなかった。

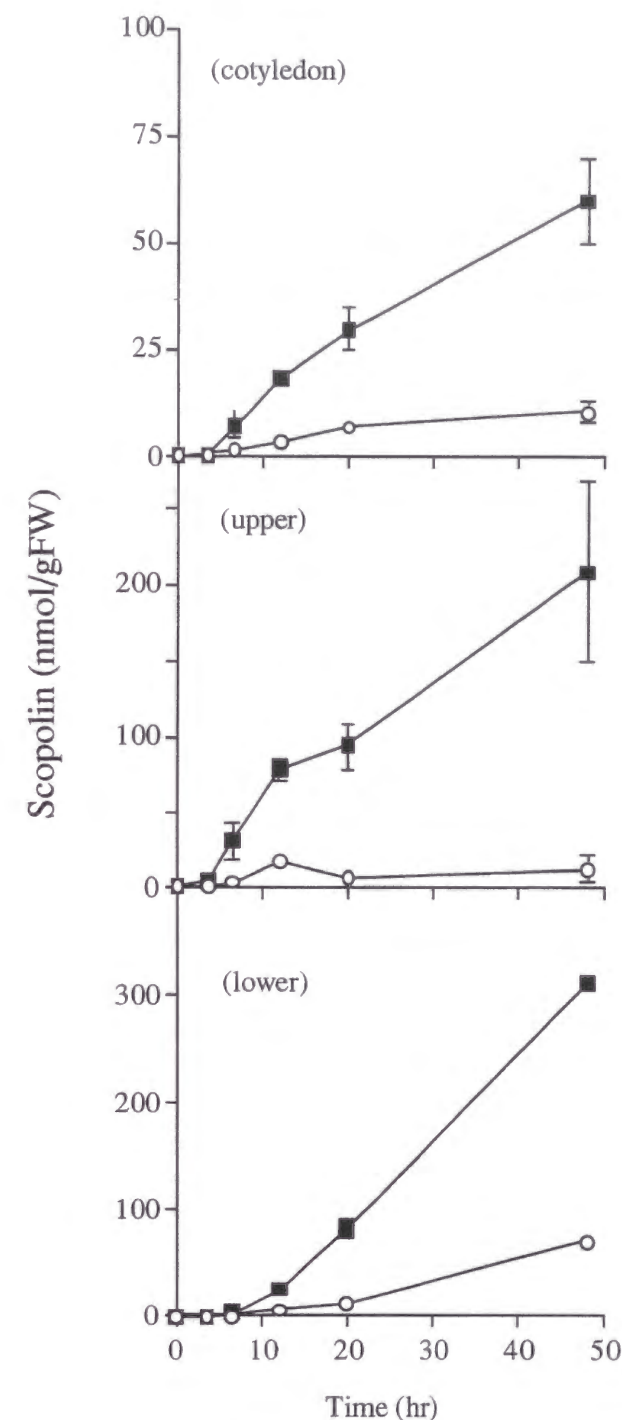


Figure 4-7 処理後ソライロアサガオ組織内の scopolin 含量の変動。子葉 (上), 茎上部 (中央), 茎下部 (下) それぞれの部位の含量を示した。○は蒸留水 20 時間前処理区, ■は NPF ( $10^8$  孢子/ml) 20 時間前処理区である。幼苗はそれぞれの前処理の後蒸留水に移植した。

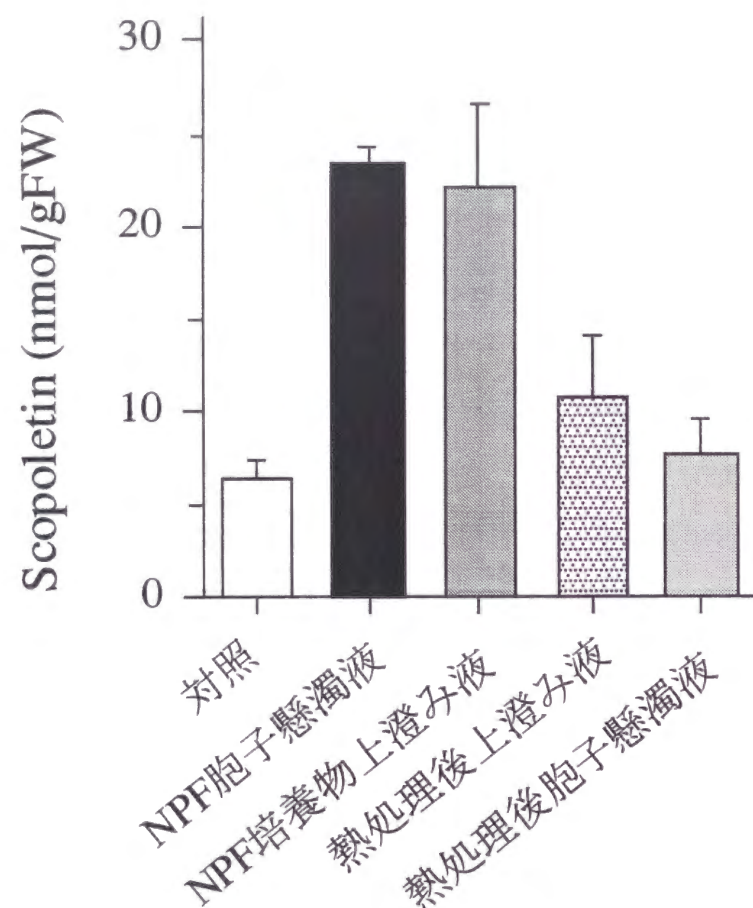


Figure 4-8 NPF培養物処理後ソライロアサガオ茎下部の scopoletin 含量.  
それぞれの処理液による前処理を 20 時間行った後の茎下部の scopoletin 含  
量の平均値を標準誤差 (n=3) とともに示している。

#### 4-4-5 Scopoletinおよびscopolin の抗PF 活性

PF 胞子を含む PSA 培地上に scopoletin および scopolin を 1-100  $\mu\text{g}$  しみこませた  
濾紙のまわりには、阻止円は見られなかった。

また scopoletin もしくは scopolin を含む水溶液中で PF の発芽率を計測したが、  
対照区と差がなかった (Table 4-3) 。

Table 4-3 Scopoletin もしくは scopolin 溶液中の PF 胞子の発芽率

処理液	ppm	% germination
scopoletin	10	74.3
	100	72.9
scopolin	10	68.7
	100	88.9
対照		71.6

それぞれの処理区は 1 % (v/v) エタノールおよび 1 % (w/v) ショ糖を含む溶液で 24  
時間行った。PF 胞子密度は  $10^5$  /ml で行った。

#### 4-4-6 Scopoletinおよびscopolin の病徴に与える影響

第 2 章で述べた方法に従い scopoletin および scopolin の抵抗性誘導活性を検討し  
た。蒸留水処理区では 7 日間の PF 処理によって激しい子葉の黄化が生じた。その時  
の葉緑素含量は 0.83 mg/g FW であった。この葉緑素の激しい減少は NPF の前処理  
によって軽減された (Table 4-4) 。 Scopoletin および scopolin にはこのような葉緑素  
の減少を軽減するような効果は見られなかった。これらの化合物をそれぞれ 20 時間  
前処理した後、PF 処理を 7 日間行った処理区の子葉中の葉緑素含量は対照区のそれ  
とほぼ同等であった。



Table 4-4 PF 処理後ソライロアサガオ子葉中の葉緑素含量

前処理	ppm	葉緑素 (mg/gFW)
scopoletin	100	1.03±0.18
	10	0.79±0.16
	1	0.87±0.05
scopolin	100	0.78±0.05
	10	0.91±0.05
	1	0.73±0.02
対照区		0.83±0.11
NPF <sup>a)</sup>		1.94±0.15

それぞれの前処理は 20 時間行った。前処理の後 PF 処理を 7 日間行った後の子葉中に含まれる葉緑素含量の平均値 (±SE, n=3) を示した。それぞれの処理区は 1 % エタノールを含む処理液で行った。

a) NPF 孢子懸濁液 (10<sup>8</sup> /ml)。

#### 4-5 考察

本章における目的は NPF 処理の結果ソライロアサガオ体内に PF に対する抵抗性が獲得されているか否かの、簡便な生化学的なマーカーを見出すことであった。植物は病原と相互作用するとき様々な反応をする。今回はそのなかで NPF 処理後にしよずる、ソライロアサガオ体内に生ずる二次代謝変動について検討を行った。

Phenylalanine ammonia-lyase (PAL) はフェニルプロパノイド経路における鍵酵素の一つで傷害や病原の侵入などのストレスによって誘導されることが知られている。ソライロアサガオ幼苗でも PAL のレベルは対照区で徐々に上昇するのが見られた。ここで見られた PAL の上昇は幼苗を採取するときに生じた傷害によるものであると考えられる。これに対して、NPF を処理したソライロアサガオでは PAL の急

激な増加が見られた。フェニルプロパノイド経路の活性化によって、フェノール性化合物の蓄積 (Bailey and Mansfield, 1982; Ni et al., 1996) や細胞壁のリグニン化による強化 (Keller et al., 1996; Ralph et al., 1998) が引き起こされることが知られている。

NPF 処理によって scopoletin とそのグルコース配糖体、scopolin の含量の増加がソライロアサガオで見られた。この増加は蒸留水処理区よりも早く、茎下部だけでなく茎上部および子葉でも見られた。茎部には処理後の NPF が侵入することができのかもしれないが、子葉は *Fusarium* の侵入が阻止されていることが第 2 章の結果から明らかである。このような NPF が侵入できない組織でも反応が見られたことから、NPF の刺激を全身に伝えるシグナル伝達機構がソライロアサガオに存在している可能性が示唆される。もしくはこれらの成分は体内で導管などを通して移動する可能性も考えられる。タバコ懸濁培養細胞系では、アグリコンである scopoletin は細胞外に多く見出され、配糖体 scopolin は細胞内での蓄積が見られたという報告がある (Sharan et al., 1998)。これらの化合物のソライロアサガオ体内における挙動を知るには、このような局在に関する知見が必要である。Scopoletin および scopolin の含量は scopoletin の生合成に関わる酵素群、分解に関わると考えられる scopoletin peroxidase そして scopoletin -glucosyltransferase (Bettry et al., 1995; Breton et al., 1997; Edwards et al., 1997) によって制御されていると考えられる。したがってこれらの酵素の制御と抵抗性は何らかの関係があるかもしれない。

病害抵抗性と scopoletin の蓄積の関係についていくつかの報告がなされている。タバコ (Goy et al., 1993) やサツマイモ (Modafar et al., 1993) では病害に対して抵抗性を示す品種ほどこの成分の蓄積量が多いことから、scopoletin は何らかの形で病害抵抗性に関係しているものと考えられている。しかしこれらの植物実験系においても scopoletin の役割に関しては不明である。Scopoletin はいくつかの病原に対して抗菌活性を示すことが知られている (Modafar et al., 1993; Garcia et al., 1995; Valle et al., 1997)。ソライロアサガオにおいては scopoletin と scopolin は PF 孢子に対して菌糸伸長および発芽抑制効果を示さなかった。したがって scopoletin および scopolin の抗菌活性が PF に対する抵抗性に関与していないと考えられる。

現在、SA などのカタラーゼ阻害活性を有する化合物が抵抗反応を誘導すること

が知られている (Chen et al., 1993; Chen et al., 1995; Wendehenne et al., 1998; Chen et al., 1993; Mehdy, 1994; Kauss et al., 1994). Scopoletin もタバコのカタラーゼを阻害するという報告がなされている (Hochberg and Cohen, 1977). Scopoletin 処理によってソライロアサガオに PF に対する防御効果は得られなかったが, SA と類似の作用によって, 一部ではあるが抵抗反応を誘導しているのかもしれない. したがって SA 含量やカタラーゼ阻害によって生ずる活性酸素分子種の分析が処理後のソライロアサガオで必要であると考えられる. また scopoletin および scopolin は抵抗性獲得にともなって蓄積されていたが, これらの関係についてはこれからの課題である.

NPF 培養濾液から得た上澄み液は scopoletin を誘導した. これは NPF 孢子懸濁液 ( $10^8$  孢子/ml) 処理とほぼ同等の誘導量であった. また熱処理後の上澄み液はこの活性を失ったことから, scopoletin の誘導に関わる因子は熱に弱い成分であると考えられる. 死菌孢子では scopoletin の誘導は見られなかった. この scopoletin 誘導に関わる因子は細胞壁などの孢子構成成分ではなく, 孢子が伸長してゆく際に孢子から分泌されるものなのかもしれない. さらに, この scopoletin 誘導因子の挙動は抵抗性誘導に関わる因子と類似している. このことから scopoletin の蓄積と抵抗性誘導は同じ因子によって誘導されている可能性が考えられる.

NPF のみでなく PF 孢子懸濁液 ( $10^5$  孢子/ml) 処理によっても scopoletin が誘導された. しかし PF 孢子を  $10^8$ /ml で 20 時間処理を行うと, scopolin の誘導は対照区の約半分となり, 茎部と子葉に激しい萎れ症状が見られた. PF 処理の結果, scopolin の誘導よりも先に生体機能の攪乱, 破壊が生じて誘導される量が減少したものである. もしくは抵抗反応を抑える成分が PF によって産生されている可能性も考えられる. このことから, ソライロアサガオが抵抗性を決定できるか否かの決定に際して, 病原菌の有する病原力に関わる因子, 例えば種々の分解酵素や植物に毒性を示す成分, そしてサプレッサーといった成分が, 重要であるようである. したがって, PF の産生する成分の分析が, ソライロアサガオと NPF, PF の相互作用を理解する上で不可欠である.

Scopoletin と scopolin の蓄積は処理後迅速に生じておりかつ再現性も高いため NPF とソライロアサガオの相互作用の良いマーカーであると考えられる. これをマー

カーとして用いることにより, 抵抗性誘導に関わる因子の解析がより簡便に行うことができ, さらに抵抗性誘導機構に関する化学的な知見が得られるものと考えられた.



## 5. サツマイモつる割れ病菌の産生する植物毒素

### 5-1 緒論

植物に感染し増殖してゆく過程で、病原菌は毒性物質を分泌することにより植物の代謝の攪乱や細胞の破壊を引き起こし、自らの感染、栄養生長がより容易になる環境を作り上げる。このような毒性物質は phytotoxin と呼ばれる。実際に病原菌の培養物や抽出物によって無生物的に病徴が再現される例が見出されており、これらの成分が感染の成立や病徴の発現に関して重要な役割を果たしていると考えられている。

サツマイモつる割れ病の場合、PF の培養液処理によってサツマイモ苗に葉の黄化などの病徴に似た症状が再現される (Ogawa, 1988) ことから、PF の感染時に何らかの毒素成分が関与していることが考えられる。そこで、PF の産生する、病徴の発現に関わる因子を明らかにするため、ここで検定系としては、サツマイモに代わる簡便なモデル系としてソライロアサガオ幼苗を用いて検定を行い、PF 培養物の抽出物における植物毒素成分の探索を行った。

### 5-2 材料および方法

#### 5-2-1 植物試料

サカタのタネ株式会社より購入したソライロアサガオ (*Ipomoea tricolor* cv. heavenly blue) の種子を給水した濾紙上に播種した。これを25℃明条件下で1日間栽培し、得られた幼苗を植物体試料として供試した。

また、同様の条件でタカヤマシード株式会社より購入したレタス種子 (*Lactuca sativa* cv. president) を栽培した幼苗をレタス植物体試料として供試した。

#### 5-2-2 菌体試料および抽出、分画

サツマイモつる割れ病菌 (*F. oxysporum* f.sp. *batatas* O-17 : PF) の保存菌体は平板ジャガイモ-しょ糖-寒天培地にて保存した。この保存菌株をジャガイモ-しょ糖-寒天培地上 (20 ml, 90 mm I.D. プラスチックシャーレ内, 300 枚) に接種し2週間25℃, 暗条件下で培養した。これらを培地ごとアセトン 71 に浸漬し一晩室温で放置し、抽出した。得られたアセトン抽出液を減圧下で濃縮し、残渣を当量のヘキサンで2回抽出しヘキサン層を合一後、 $\text{MgSO}_4$  で乾燥した。このヘキサン層を減圧下で濃縮しヘキサン画分 830 mg を得た。水層部分をさらに当量のトルエン、酢酸エチルの順でそれぞれ2回ずつ抽出し同様の操作により、トルエン画分 90 mg, 酢酸エチル画分 390 mg を得た。ヘキサン画分に関してシリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィー (Merck 社製, Silica gel 60, 20g) を用いて分画した。移動相はヘキサン/酢酸エチル混合溶媒を用いた。混合比 = 20/1 の混合溶媒で平衡化したカラムに試料をチャージし、エアーポンプを用いて移動相を流した。混合比は 9/1 から順に 8/2, 7/3, 6/4, 5/5, 4/6, 3/7, 0/1 まで酢酸エチル含量を徐々に増加させ最後にメタノールをそれぞれ 300 ml ずつ分取した。各画分の組成は薄層クロマトグラフィー (TLC; Merck DC-Alufolien Kieselgel 60 F<sub>254</sub>) 上で紫外吸収および 50% 硫酸を噴霧した後加熱することにより確認した。ヘキサン/酢酸エチル = 5/5 から 0/1 で溶出される画分は TLC 上で単一成分であったため、合一し成分 5-A (63.5 mg) を得た。またヘキサン/酢酸エチル = 9/1 から 6/4 で溶出される画分はシリカゲルフラッシュクロマトグラフィーによる更なる分画が困難であると思われたため、合一し逆相 HPLC による分画を行った。25℃に保ったカラム, COSMOSIL 5C18-AR (250×10 mm I.D.) を用いた。移動相 70 % (v/v) メタノール水溶液でこのカラムを平衡化し試料を注入した。これを流速 3 ml/min で同様の溶媒を流すことにより溶出させた。ピーク溶出の検出は UV 254nm にて行った。保持時間 5.5 分で溶出する活性成分 5-B (8.8mg) を得た。以上の精製操作の流れを Figure 5-1 に示した。

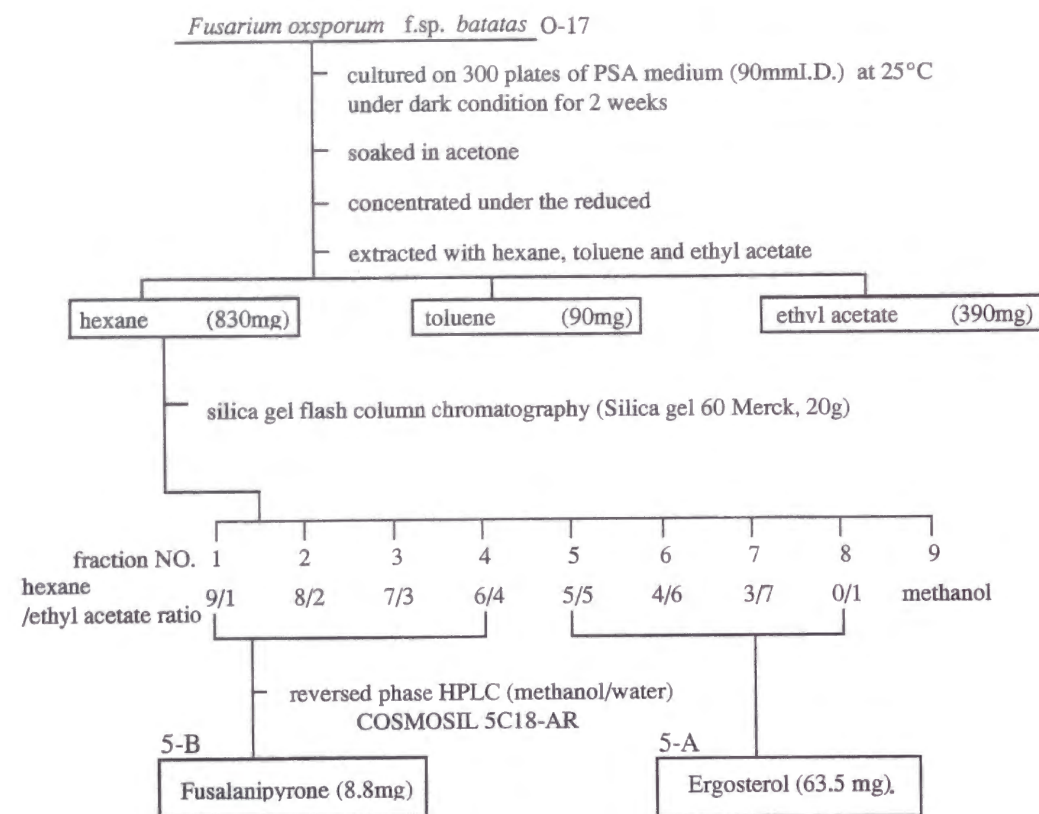


Figure 5-1 Scheme of the procedures to extraction from PF and fractionation of the extract.

### 5-2-3 活性成分の同定

成分 5-B は chloroform-*d* 中で  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトルをそれぞれ 300, 75 MHz で BRUKER AC-300 にて測定した。質量分析は Perkin-Elmer Sciex API 165 にて、大気圧イオン化法を用いて測定した。

### 5-2-4 幼苗伸長阻害活性試験

得られた画分シャーレ 5 枚分に相当する抽出物をそれぞれ 90 mmI.D. ガラスシャーレ内に敷いた濾紙にしみこませ、風乾した。次にこのシャーレに 0.05% (v/v) Tween® 20 水溶液 10 ml を注入した。これにソライロアサガオ幼苗もしくはレタス幼苗を置き、3 日間 25°C、明条件下でさらに保持したのち幼苗の茎部および根部の

合わせた長さを計測した。なおソライロアサガオ幼苗は伸長にともなって天地が逆転しないように、プラスチック製家庭用網戸の網に幼苗の根部を差し込むことで幼苗を固定し、試験を行った。

## 5-3 結果

### 5-3-1 ソライロアサガオ幼苗に対する伸長阻害活性を有する成分の分画と同定

Figure 5-1 に示したように PF 抽出液の分画を行ったところ、ヘキサン画分に強い活性が見られた (Figure 5-2)。

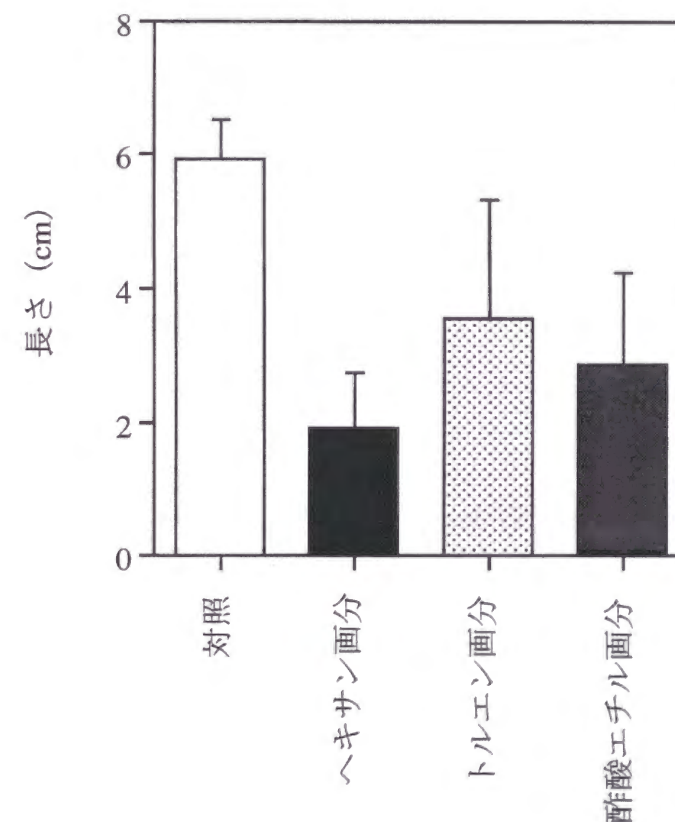


Figure 5-2 PF抽出物各画分処理後のソライロアサガオ幼苗の長さ



このヘキサン画分についてさらに活性を追跡しながら分画を進めたところ、無色粉状物成分 5-A (63.5 mg) および黄色油状成分 5-B (8.8 mg) を得た。成分 5-A は TLC 上で、標品との cochromatography により ergosterol と同定した。成分 5-B は各種機器分析によりその構造を解析した。API-MS で  $[M+H]^+=165$  を示したことから、分子量を 164 と決定した。NMR 測定の結果を Table 5-1 に示した。これらの結果から、既報の化合物 fusalanipyrone (Abraham and Arfmann, 1988; Barrero et al., 1993) であると推定された。また HMQC, HMBC などの結果はこの推定構造を支持していた (Figure 5-3)。

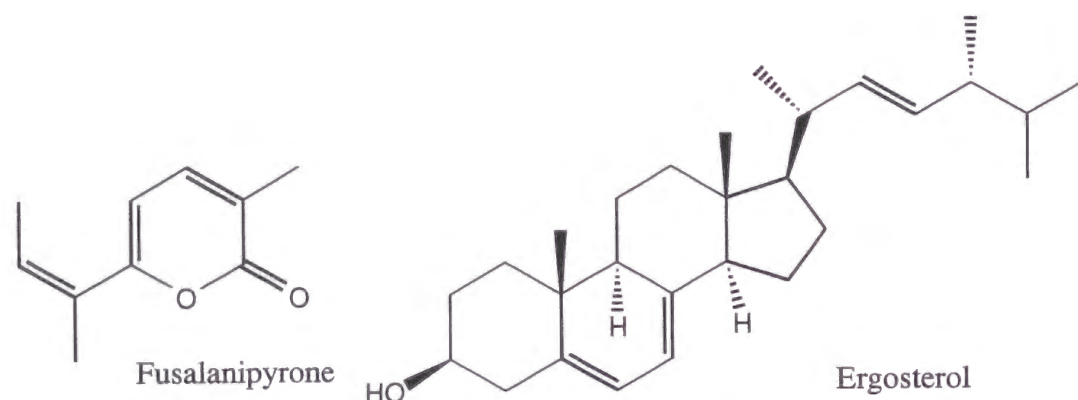


Figure 5-3 PF から抽出されたソライロアサガオ幼苗伸長阻害活性を有する成分

### 5-3-2 ソライロアサガオ幼苗およびレタス幼苗に対する伸長阻害活性

Ergosterol について 0.1 ppm から 10 ppm までの処理濃度でソライロアサガオ幼苗伸長阻害試験を行った (Figure 5-4)。対照区幼苗の長さは 2.9 cm であったが ergosterol 1 ppm 処理区では 1.7 cm と伸長阻害活性が見られた。しかし、0.1 ppm 処理区阻害活性は見られなかった。この処理区では 2.6 cm とほぼ対照区と同じ長さまで幼苗は伸長した。Ergosterol 80ppm でレタスに処理を行ったが、2.9 cm と対照区の長さ、3.1 cm と同等で伸長阻害活性は見られなかった。

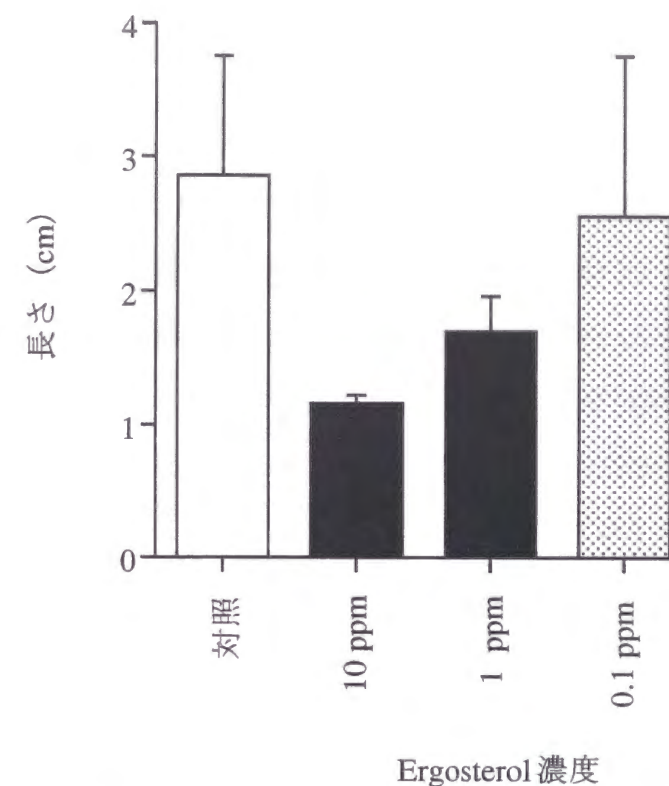


Figure 5-4 Ergosterol 処理後のソライロアサガオ幼苗の長さ

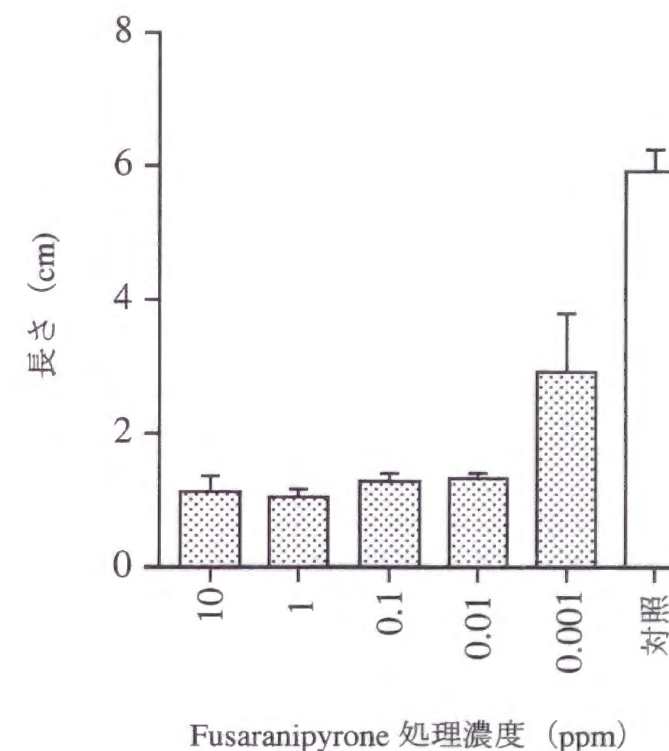


Figure 5-5 Fusalanipyrone 濃度とソライロアサガオ幼苗長さ

Fusalanipyrone を 0.001, 0.01, 0.1, 1 および 10 ppm でソライロアサガオ幼苗に処理した後の、それぞれの処理区の幼苗の長さを Figure 5-5 に示した。対照区では約 6 cm であったのに対し、fusalanipyrone を含む処理区では 0.001 ppm においても約 3 cm と伸長阻害活性を示した。それ以上の濃度で fusalanipyrone を処理した幼苗の長さは約 1.5 cm と強い伸長阻害が見られた。また fusalanipyrone 処理区で 0.1 ppm 以上で葉部の白化現象が見られた。一方、レタス幼苗における伸長阻害活性について、10 ppm fusalanipyrone 処理区のレタス幼苗は対照処理区と同等の長さ (2.6 cm) となった (Figure 5-6)。

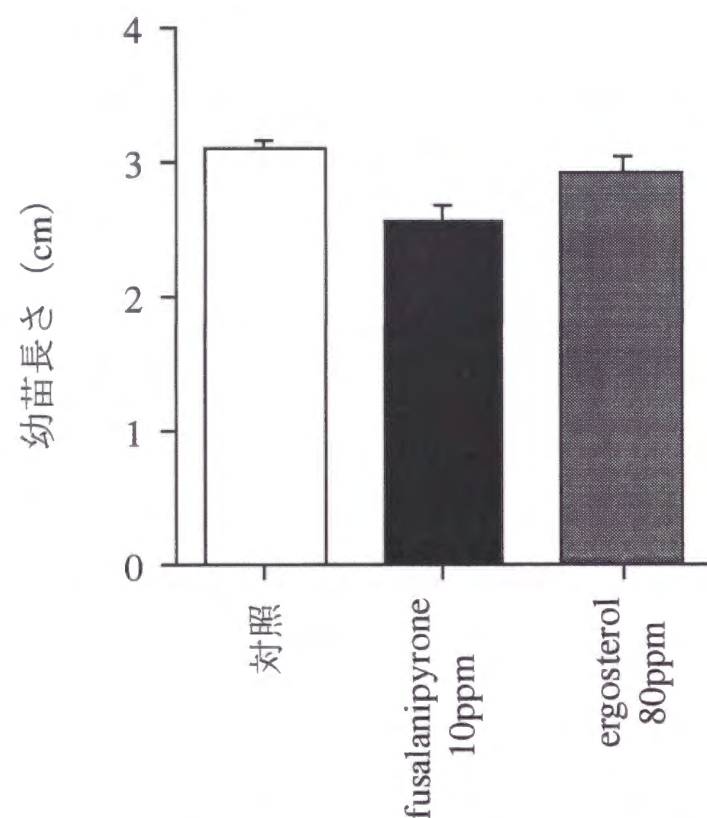


Figure 5-6 PF 抽出物処理後のレタス幼苗の長さ

#### 5-4 考察

ソライロアサガオに伸長阻害活性を示す成分として PF 培養物から fusalanipyrone および ergosterol を単離した。Fusalanipyrone はソライロアサガオ幼苗に対しては 0.001 ppm で伸長阻害活性を示したが、レタス幼苗に対しては 10 ppm においても伸長阻害を示さなかったことから、ソライロアサガオに対して選択的な毒性を有していると考えられる。*Fusarium oxysporum* には多くの分化型がある (渡邊恒雄, 1998) が、この分化型を決定する因子が何であるかに関しては不明である。PF の病原型 (forma specialis) を決定する上で重要な役割を果たしているのかもしれない。

Fusalanipyrone は  $\alpha$ -pyrone 環を有する monoterpene で、nectriapyrone の抗菌活性が報告されている (Barrero et al., 1993)。また、同じく  $\alpha$ -pyrone 環を有する pestalopyrone はアサガオの葉に壊死斑を生じさせる活性を有しているとの報告がある (Venkatasubbaiah et al., 1991)。しかしながら、fusalanipyrone の植物に対する活性についての報告はこれまでにない。本章で見られたソライロアサガオ幼苗の葉部に見られた白化現象は fusalanipyrone 処理によって植物に何らかの代謝変動を引き起こした結果生じたものと考えられる。ソライロアサガオ幼苗中に生じているこの代謝変化を追跡することで fusalanipyrone の作用機鎖に関する何らかの知見が得られるものと考えられる。



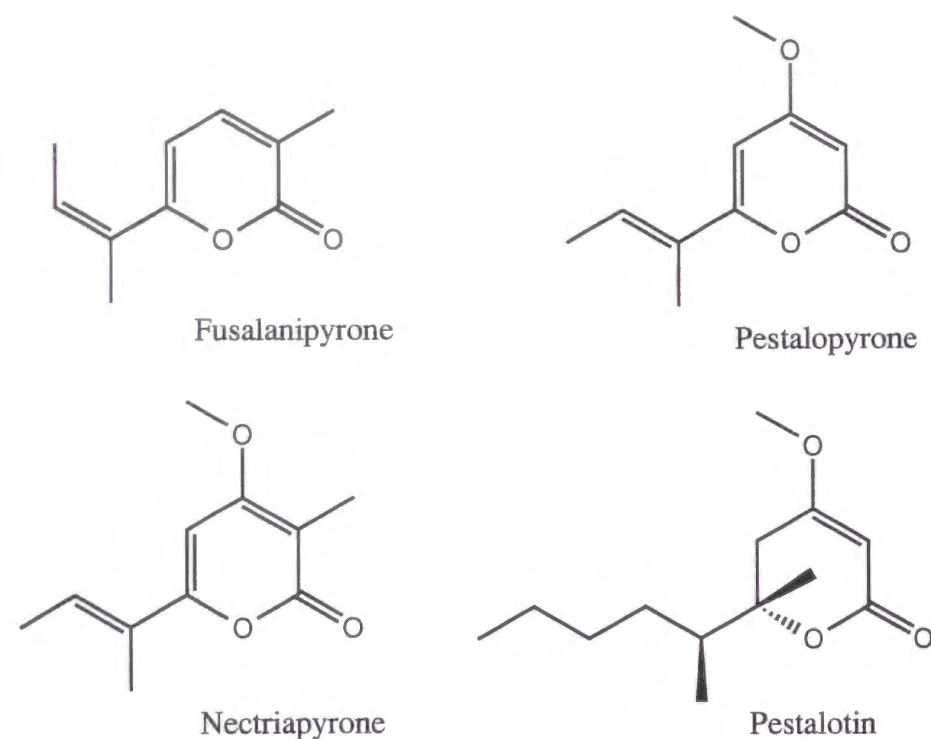


Figure 5-6  $\alpha$ -Pyrone 環を有する fusalanipyron とその類縁体

## 6. 総括

本研究では NPF による病害抵抗性誘導に関わる化学因子の解明を目的として、サツマイモおよびソライロアサガオを用いて以下に示す種々の検討を行った。

### 6-1 サツマイモについて

サツマイモのファイトアレキシンである ipomeamarone と NPF によって誘導されるサツマイモの割れ病に対する抵抗性の関係について検討を行った。その結果、NPF 処理により抵抗性を獲得した状態にあるサツマイモ地上部組織中には、PF 胞子の発芽を十分に抑えることのできるレベルの ipomeamarone は蓄積されていなかったことから、本現象に ipomeamarone は関与していないと結論した。Ipomeamarone 以外の抗菌性物質、例えば ipomeamarone 生合成の前駆体である dehydroipomeamarone や ipomeamanol などについての更なる検討が必要であると考えられた。

### 6-2 ソライロアサガオについて

サツマイモ地上部は実験室での均一な試料の調製や取り扱いが困難であったため、近縁種に属するソライロアサガオを用いたモデル系の構築を試みた。市販のソライロアサガオ種子を用いることで植物試料の調製がより簡便になり、かつ均一な試料を大量に得ることが可能となった。

このソライロアサガオの播種後 1 日の幼苗を用いて PF 代謝産物中の伸長阻害を示す成分の探索を行った結果、ergosterol および fusalanipyron を単離した。特に fusalanipyron はソライロアサガオに高い活性を示したのに対し、レタスには阻害活性を示さなかったことから、PF の病原性を決定する際に何らかの役割を果たしている可能性が示された。

一方、ソライロアサガオの子葉は PF 処理によって著しく黄化した。そこで子葉中の葉緑素を定量することにより、簡便に PF による病徴を定量的に評価する系を

確立した。またこの系を用いることによってソライロアサガオにもサツマイモと同様に NPF 処理によって PF に対する抵抗性が誘導されることが明らかとなった。抵抗性獲得状態にあるソライロアサガオでは子葉、第一葉および茎頂への菌の侵入が抑制されていたことから、この葉緑素の減少に対する抑制効果は子葉組織への侵入を抑制することにより得られているものと考えられた。

ソライロアサガオに処理した植物ホルモンおよび抵抗性活性化薬剤のなかで、abscisic acid および trifluralin が抵抗性誘導効果を示した。このことにより NPF による抵抗性誘導に abscisic acid に応答する経路が関与している可能性が示唆された。また trifluralin の作用機作に関しては不明であるが、今後これをプローブとした誘導機作に関する知見から、何らかの情報が得られるものと期待される。また NPF の代謝産物中の abscisic acid 様の活性を示す成分の検索も必要である。

NPF 処理後のソライロアサガオ組織内に生ずる代謝変動に関して PAL 活性に顕著な変化が見られた。このことから NPF との相互作用によってソライロアサガオはフェニルプロパノイド生合成経路を活性化していることが明らかとなった。さらに抵抗性獲得に伴ってソライロアサガオ組織内に scopolin, scopoletin の蓄積が見られた。これらの化合物に抗 PF 活性は見られず、その生理的役割は不明であるが、NPF との相互作用を解析する上で、迅速かつ簡便な指標となると考えられた。また PF は scopolin, scopoletin の誘導を強く抑制したことから、PF が産生する抵抗反応を抑える成分の存在および感染成立に際してのそれらの重要性が示唆された。

NPF 培養液を遠心して得られた上澄み液によって、ソライロアサガオに無生物的に抵抗性が誘導されたことから、抵抗性誘導に NPF の産生する何らかの化学物質が関与していることが明らかとなった。またこの抵抗誘導に関わる因子は熱に不安定な成分であると考えられた。

本研究で確立したソライロアサガオを用いた検定系は簡便に誘導された抵抗性を評価することができた。また scopolin および scopoletin 含量が、菌と植物の相互作用によって生ずる反応の検出に際して、再現性よく測定できる指標値として有用であると考えられた。これを用いてさらに NPF の有する抵抗性誘導因子の解明が期待される。

#### 本研究に関する原著論文など

Shimizu, B., Fujimori, A., Miyagawa, H., Ueno, T., Watanabe, K., and Ogawa, K.  
Resistance against fusarium wilt induced by non-pathogenic *Fusarium* in *Ipomoea tricolor*, submitted.

Shimizu, B., Uemura, I., Miyagawa, H., Ueno, T., Watanabe, K., and Ogawa, K.  
Ipomeamarone, a phytoalexin of sweet potato is not involved in the induced resistance by non-pathogenic *Fusarium* in sweet potato, in preparation.

Shimizu, B., Miyagawa, H., Ueno, T., Watanabe, K., and Ogawa, K.  
Morning glory, *Ipomoea tricolor* cv. heavenly blue systemically accumulates scopoletin and scopolin after interaction with *Fusarium*, in preparation.

#### 関係論文

Nakagawa, Y., Shimizu, B., Oikawa, N., Akamatsu, M., Nishimura, K., Kurihara, N., Ueno, T., and Fujita, T. In "Three-dimensional quantitative structure-activity analysis of steroidal and dibenzoylhydrazine-type ecdysone agonists", ed. by Hansch, C. and Fujita, T., (1995) *ACS Symposium Series 606*, American Chemical Society, Washington DC, 288-301.

Shimizu, B., Nakagawa, Y., Hattori, K., Nishimura, K., Kurihara, N., and Ueno, T. (1997)  
Molting hormonal and larvicidal activities of aliphatic acyl analogs of dibenzoylhydrazine insecticides. *Steroids* 62, 638-64.

Nakagawa, Y., Hattori, K., Shimizu, B., Akamatsu, M., Miyagawa, H., and Ueno, T. (1998)  
Quantitative structure-activity studies of insect growth regulators XIV. Three-dimensional quantitative structure-activity relationship of ecdysone agonists including dibenzoylhydrazine analogs. *Pesticide Science* 53, 267-277.



## 参考文献

- Abraham, W.-R., and Arfmann, H.-A. (1988). Fusaranipyrone, a monoterpenoid from *Fusarium solani*. *Phytochemistry* 27, 3310-3311.
- Ahl-Goy, P., Singner, H., Reist, R., Aichholz, R., Blum, W., Schmidt, E., and Kessmann, H. (1993). Accumulation of scopoletin is associated with the high disease resistance of hybrid *Nicotiana glutinosa* × *Nicotiana debneyi* 191, 200-206.
- Arinze, A. E., and Smith, I. M. (1980). Antifungal furanoterpenoids of sweet potato in relation to pathogenic and non-pathogenic fungi. *Physiological Plant Pathology* 17, 145-155.
- Arnon, D. I. (1949). Copper Enzyme in Isolated Chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta Vulgaris*. *Plant Physiology* 24, 1-15.
- Bailey, J. A., and Mansfield, J. W. (1982). *Phytoalexins* (New York: John Wiley).
- Baker, R., Hanchey, P., and Dotterar, S. D. (1978). Protection of carnation against fusarium stem rot by fungi. *Phytopathology* 68, 1495-1501.
- Barrero, A. F., Oltra, J. E., Herrador, M. M., Cabrera, E., Sanchez, J. F., Quílez, J., Rojas, F. J., and Reyes, J. (1993). Gibepyrone:  $\alpha$ -pyrones from *Gibberella fujikuroi*. *Tetrahedron* 49, 141-150.
- Benhamou, N., and Bélanger, R. R. (1998). Benzothiadiazole-mediated induced resistance to *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* in Tomato. *Plant Physiology* 118, 1203-1212.
- Betry, P., Fliniaux, M. A., Mackova, M., Gillet, F., Macek, T., and Dubreuil, A. J. (1995). Scopoletin-glucosyltransferase activity from *Duboisia myoporoides*; improvement of cultivation conditions and crude extract preparation procedure. *Journal of Plant Physiology* 146, 503-507.
- Blechert, S., Brodschelm, W., Hölder, S., Kammerer, L., Kutchan, T. M., Mueller, M. J., Xia, Z.-Q., and Zenk, M. H. (1995). The octadecanoic pathway: Signal molecules for the regulation of secondary pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 92, 4099-4105.
- Bolter, C., Brammall, R. A., Cohen, R., and Lazarovits, G. (1993). Glutathione alterations in melon and tomato roots following treatment with chemicals which induce disease resistance to *Fusarium wilt*.
- Breton, F., Sanier, C., and D'Auzac, J. (1997). Scopoletin production and degradation in relation to resistance of *Hevea brasiliensis* to *Corynespora cassicola*. *Journal of Plant Physiology* 151, 595-602.
- Burka, L. T., Bowen, R. M., Wilson, B. J., and Harris, T. M. (1974). 7-Hydroxymyoporone, a new toxic furanosesquiterpene from mold-damaged sweet potatoes. *Journal of Organic Chemistry* 39, 3241-3244.
- Burka, L. T., and Iles, J. (1979). Myoporone and related keto alcohols from stressed sweet potatoes. *Phytochemistry* 18, 873-874.
- Chen, Z., Malamy, J., Henning, J., Conrath, U., Sánchez-Casas, P., Silva, H., Ricigliano, J., and Klessig, D. F. (1995). Induction, modification, and transduction of the salicylic acid signal in plant defence responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 92, 4134-4137.
- Chen, Z., Ricigliano, J. W., and Klessig, D. F. (1993). Purification and characterization of a soluble salicylic acid-binding protein from tobacco. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 90, 9533-9537.
- Chen, Z., Silva, H., and Klessig, D. F. (1993). Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. *Science* 262, 1883-1886.
- Cheong, J.-J., Birberg, W., Fügedi, P., Pilotti, e., Garegg, P. J., Hong, N., Ogawa, T., and Hahn, M. G. (1991). Structure-activity relationships of oligo- $\beta$ -glucoside elicitor of phytoalexin accumulation in soybean. *The Plant Cell* 3, 127-136.
- Cheong, J.-J., and Hahn, M. G. (1991). A specific, high-affinity binding site for the hepta- $\beta$ -glucoside elicitor exists in soybean membranes. *The Plant Cell* 3, 137-147.
- Clark, C. A., Lawrence, A., and Martin, F. A. (1981). Accumulation of furanoterpenoids in sweet potato tissue following inoculation with different pathogens. *Phytopathology* 71, 708-711.
- Cohen, Y., Gisi, U., and Niderman, T. (1993). Local and systemic protection against *Phytophthora infestans* induced in potato and tomato plants by jasmonic acid and jasmonic methyl ester. *Phytopathology* 83, 1054-1062.
- Creelman, R. A., and Mullet, J. E. (1995). Jasmonic acid distribution and action in plants: Regulation during development and response to biotic and abiotic stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 92, 4114-4119.



Delaney, T. P., Friedrich, L., and Ryals, J. A. (1995). *Arabidopsis* signal transduction mutant defective in chemically and biologically induced disease resistance. Proceedings of the National Academy of Sciences of USA 92, 6602-6606.

Delaney, T. P., Uknes, S., Vernooji, B., Friedrich, L., Weymann, K., Negrotto, D., Gaffney, T., Gut-Rella, M., Kessmann, H., Ward, E., and Ryals, J. (1994). A central role of salicylic acid in plant disease resistance. Science 266, 1247-1250.

Doares, S. H., Syrovets, T., Weiler, E. W., and Ryan, C. A. (1995). Oligogalacturonides and chitosan activate plant defensive genes through the octadecanoid pathway. Proceedings of the National Academy of Sciences of USA 92, 4095-4098.

Doubrova, N. S., Dean, R. A., and Kuć, J. (1988). Induction of systemic resistance to anthracnose caused by *Colletotrichum lagenarium* in cucumber by oxalate and extrancts from spinach and rhubarb leaves. Physiological and Molecular Plant Pathology 33, 69-79.

Edwards, R., Stones, S. M., Gutiérrez-Mellado, M.-C., and Jorin, J. (1997). Characterization and inducibility of scopoletin-degrading enzyme from sunflower. Phytochemistry 45, 1109-1114.

Garcia, D., Sanier, C., Macheix, J. J., and D'auzac, J. (1995). Accumulation of scopoletin in *Hevea brasiliensis* infected by *Microcyclus ulei* (P. Henn.) V. ARX and evaluation of its fungitoxicity for three leaf pathogens of rubber tree. Physiological and Molecular Plant Pathology 47, 213-223.

Gessler, C., and Kuć, J. (1982). Induction of resistance to fusarium wilt in cucumber by root and foliar pathogens. Phytopathology 72, 1493-1441.

Görlach, J., Volrath, S., Knauf-Beiter, G., Hengy, G., Beckhove, U., Kogel, K.-H., Oosteendorp, M., Staub, T., and Kessmann, H. (1996). Benzothiadiazole, a Novel Class of Inducer of Systemic Acquired Resistance, Activates Gene Expression and Disease Resistance in wheat. The Plant Cell 8, 629-643.

Hochberg, M., and Cohen, Y. (1977). Scopoletin-induced catalase inhibition in tobacco leaves infected by *Peronospora tabacina* Adam. Israel Journal of Botany 26, 48 (one page).

Hoffland, E., Hakulinen, J., and Pelt, J. A. (1996). Comparison of systemic resistance induced by avirulent and nonpathogenic *Pseudomonas* species. Phytopathology 86, 757-762.

Honda, N. (1997). Control of *Fusarium* basal rot of rakkyo by nonpathogenic *Fusarium moniliforme* and *Fusarium oxysporum*. In PSJ Biocontrol Workshop, K. Tsuchiya and N. Matsumoto, eds. (Nagoya, Japan: PSJ Biocontrol Workshop), pp. 107.

Honda, Y. (1997). Control of virus diseases by attenuated viruses. In PSJ Biocontrol Workshop, K. Tsuchiya and N. Matsumoto, eds. (Nagoya, Japan: PSJ Biocontrol Workshop), pp. 107.

Hyodo, H., Uritani, I., and Akai, S. (1969). Production of furano-terpenoids and other compounds in sweet potato root tissue in response to infection by various isolates of *Ceratocystis fimbriata*. Phytopathologische Zeitschrift 65, 332-340.

Imaseki, H., and Uritani, I. (1964). ipomeamarone accumulation and lipid metabolism in sweet potato infected by the black rot fungus II. Accumulation mechanism of ipomeamarone in the infected region with special regard to contribution of the non-infected tissue. Plant & Cell Physiology 5, 133-143.

Kato, N., Imaseki, H., Nakashima, N., and Uritani, I. (1971). Structure of a new sesquiterpenoid, ipomeamaronol, in disease sweet potato root tissue. Tetrahedron Letters 13, 843-846.

Katsube, K., and Akasaka, Y. (1997). Control of fusarium wilt of spinach by transplanting seedlings pretreated with non-pathogenic *Fusarium oxysporum*. Annals of the Phytopathological Society of Japan 63, 389-394.

Kauss, H., Jeblick, W., Ziegler, J., and Krabler, W. (1994). Pretreatment of parsley (*Petroselinum crispum* L.) suspension cultures with methyl jasmonate enhances elicitation of activated oxygen species. Plant Physiology 105, 89-94.

Keller, H., Hohlfeld, H., Wray, V., Hahlbrock, K., Scheel, D., and Strack, D. (1996). Changes in the accumulation of soluble and cell wall-bound phenolics in elicitor-treated cell suspension cultures and fungus-infected leaves of *Solanum tuberosum*. Phytochemistry 42, 389-398.

Kessmann, H., Staub, T., Hofmann, C., Maetzke, T., and Herzog, J. (1994). Induction of systemic acquired disease resistance in plants by chemicals. Annual Review of Phytopathology 32, 439-459.

Knogge, W. (1996). Fungal Infection of Plants. The Plant Cell 8, 1711-1722.

Kojima, M., and Uritani, I. (1976). Possible involvement of furanoterpenoid phytoalexins in establishing host-parasite specificity between sweet potato and various strains of *Ceratocystis fimbriata*. Physiological Plant Pathology 8, 97-111.

Komada, H. (1976). Studies on the evaluation of activity of *Fusarium oxysporum*, *Fusarium* pathogen of vegetable crops, in the soil. Bulletin of the Tokai-Kinki National Agricultural Experiment Station 29, 132-269.



Kunz, W., Staub, T., Métraux, J. P., Högerle, K., Nyfeler, R., and Goy, P. A. A. (Ciba-Gigy Corporation) (1988). Method for protecting plants against disease. In Japan Kokai Tokkyo Koho, JP 63-93766.

Malamy, J., Carr, J. P., Klessig, D. F., and Raskin, I. (1990). Salicylic Acid: A Likely Endogenous Signal in the Resistance Response of Tobacco to Viral Infection. *Science* 250, 1002-1004.

Mehdy, M.-C. (1994). Active oxygen species in plant defense against pathogens. *Plant Physiology* 105, 467-472.

Meuwly, P., Mölders, W., Buchala, A., and Métraux, J.-P. (1995). Local and Systemic Biosynthesis of Salicylic Acid in Infected Cucumber Plants. *Plant Physiology* 109, 1107-1114.

Mills, P. R., Gussin, E. J., and Wood, R. K. S. (1986). Induction of resistance in cucumber to *Colletotrichum lagenarium* by 6-benzylaminopurine. *Journals of Phytopathology* 116, 11-17.

Mills, P. R., and Wood, R. K. S. (1984). The effects of polyacrylic acid, acetylsalicylic acid on resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. *Phytopathological Zeitschrift* 111, 209-216.

Modafar, C. E., Clerivet, A., Fleuriet, A., and Macheix, J. J. (1993). Inoculation of *Platanus Acerifolia* with *Ceratocystis fimbriata* f.sp. *platani* Induced Scopoletin and Umbelliferone Accumulation. *Phytochemistry* 34, 1271-1276.

Ni, W., Fahrendorf, T., Ballance, G.-M., Lamb, C.-J., Dixon, R.-A. (1996). Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.) XX. Transcriptional activation of phenylpropanoid pathway genes in elicitor-induced cell suspension cultures. *Plant Molecular Biology* 30, 427-438.

Nonaka, F., and Yasui, K. (1973). On the selective toxicity of ipomeamarone towards the phytopathogens. *Agricultural Bulletin of Saga University* 22, 39-49.

Oba, K., Oga, K., and Uritani, I. (1982). Metabolism of ipomeamarone in sweet potato root slice before and after treatment with mercuric chloride or infection with *Ceratocystis fimbriata*. *Phytochemistry* 21, 1921-1925.

Ogawa, K. (1988). Studies on *Fusarium* wilt of sweet potato. *Bulletin of the National Agriculture Research Center* 10, 1-97.

Ogawa, K., and Komada, H. (1984). *Fusarium* wilt of sweet potato by non-pathogenic *Fusarium oxysporum*. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 50, 1-9.

Oguni, I., and Uritani, I. (1973). Isolation of dehydro- ipomeamarone , a new sesquiterpenoid from the black-rot fungus infected sweet potato root tissue and its relation to the biosynthesis of ipomeamarone . *Agricultural Biology and Chemistry* 37, 2443-2444.

Pieterse, C. J., Wees, S. C. M., Hoffland, E., Pelt, J. A., and Loon, L. C. (1996). Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by biocontrol bacteria is independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene expression. *The Plant Cell* 8, 1225-1237.

Pospieszny, H., Chirkov, S., and Atabekov, J. (1991). Induction of antiviral resistance in plant by chitosan. *Plant Science* 79, 63-68.

Ralph, J., Hatfield, R. D., Piquemal, J., Yahiaoui, N., Pean, M., Lapierre, C., and Boudet, A. M. (1998). NMR characterization of altered lignins extracted from tobacco plants down-regulated for lignification enzymes cinnamyl alcohol dehydrogenase and cinnamoyl-CoA reductase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 95, 12803-12808.

Rausher, M. D., Iwao, K., Simms, E. L., Ohsaki, N., and Hall, D. (1993). Induced Resistance in *Ipomoea purpurea*. *Ecology* 74, 20-29.

Ryals, J., Lawton, K. A., Delaney, T. P., Friedrich, L., Kessmann, H., Neuenschwander, U., Uknes, S., Vernooij, B., and Weymann, K. (1995). Signal transduction in systemic acquired resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 92, 4202-4205.

Schneider, J. A., Lee, J., Naya, Y., Nakanishi, K., Oba, K., and Uritani, I. (1984). The fate of the phytoalexin ipomeamarone : Furanoterpenes and butenolides from *Ceratocystis fimbriata*-infected sweet potatoes. *Phytochemistry* 23, 759-764.

Schottens-Toma, I. M. J., and Wit, P. J. G. d. (1988). Purification and primary structure of a necrosis-inducing peptide from the apoplastic fluids of tomato infected with *Cladosporium fulvum* (syn. *Fulvia fulva*). *Physiological and Molecular Plant Pathology* 33, 59-67.

Schweizer, P., Buchala, A., and Métraux, J.-P. (1997). Gene Expression Patterns and Levels of Jasmonic Acid in Rice Treated with the Resistance Inducer 2,6-Dichloroisonicotinic Acid. *Plant Physiology* 115, 61-70.

Sharan, M., Taguchi, G., Gonda, K., Jouke, T., Shimosaka, M., Hayashida, N., and Okazaki, M. (1998). Effects of methyl jasmonate and elicitor on the activation of phenylalanine ammonia-lyase and the accumulation of scopoletin and scopolin in tobacco cell cultures. *Plant Science* 132, 13-19.

Shulaev, V., Silverman, P., and Raskin, I. (1997). Airborne signaling by methyl salicylate in plant pathogen resistance. *Nature* 385, 718-721.



Siegrist, J., Jeblick, W., and Kauss, H. (1994). Defence responses in infected and elicited cucumber (*Cucumis sativus* L.) hypocotyl segments exhibiting acquired resistance. *Plant Physiology* 105, 1365-1374.

Simms, E. L., and Vision, T. J. (1995). Pathogen-Induced Systemic Resistance in *Ipomoea purpurea*. *Oecologia* 102, 494-500.

Soper, Q. F. (1966). Method of eliminating weed grasses and broadleaf weeds. In United States Patent Office, 3,257,190.

Starratt, A. N., and Lazarovits, G. (1999). Herbicide-induced disease resistance and associated increases in free amino acid levels in melon plants. *Canadian Journal of Plant Pathology* 21, 33-36.

Starratt, A. N., and Lazarovits, G. (1996). Increases in free amino acid levels in tomato plants accompanying herbicide-induced disease resistance. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 54, 230-240.

Sziráki, I., Balázs, E., and Király, Z. (1980). Role of different stresses in inducing systemic acquired resistance to TMV and increasing cytokinin level in tobacco. *Physiological Plant Science* 16, 277-284.

Uritani, I., Uritani, M., and Yamada, H. (1960). Similar metabolic alterations induced in sweet potato by poisonous chemicals and by *Ceratostomella fimbriata*. *Phytopathology* 50, 30-34.

Valle, T., López, J., Hernández, J., and Corchete, P. (1997). Antifungal activity of scopoletin and its differential accumulation in *Ulmus pumila* and *Ulmus campestris* cell suspension cultures infected with *Ophiostoma ulmi* spores. *Plant Science* 125, 97-101.

Venkatasubbaiah, P., Dyke, C. G. V., and Chilton, W. S. (1991). Phytotoxins produced by *Pestalotiopsis oenotherae*, a pathogen of evening primrose. *Phytochemistry* 30, 1471-1474.

Ward, E. R., Uknes, S. J., Williams, S. C., Dincher, S. S., Wiederhold, D. L., Alexander, D. C., Ahl-Goy, P., Métraux, J.-P., and Ryals, J. A. (1991). Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. *The Plant Cell* 3, 1085-1094.

Wasternack, C., and Parthier, B. (1997). Jasmonate-signalled plant gene expression. In *Trends in plant science*, pp. 302-307.

Watanabe, K., Tojima, I., and Ogawa, K. (1991). Methods of inoculation pre-planting tomato seedling with avirulent *Fusarium oxysporum* for controlling *Fusarium* wilt in tomato. *Proceedings of the Kanto-Tosan Plant Protection Society* 38, 85-87.

Weller, D. M. (1988). Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annual Review of Phytopathology* 26, 379-407.

Wendehenne, D., Durner, J., Chen, Z., and Klessig, D. F. (1998). Benzothiadiazole, an Inducer of Plant Defenses, Inhibits Catalase and Ascorbate Peroxidase. *Phytochemistry* 47, 651-657.

Whenham, R. J. (1989). Effect of systemic tobacco mosaic virus infection on endogenous cytokinin concentration in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) leave: consequences for the control of resistance and symptom development. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 35, 85-95.

Whenham, R. J., Fraser, R. S. S., Brown, L. P., and Payne, J. A. (1986). Tobacco-mosaic-virus induced increase in abscisic-acid concentration in tobacco in tobacco leaves : Intercellular location in light and dark-green areas, and relationship to symptom development. *Planta* 168, 592-589.

Yamada, A., Shibuya, N., Kodama, O., and Akatsuka, T. (1993). Induction of phytoalexin formation in suspension-cultured rice cells by *N*-acetylchitoologosaccharides. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 57, 405-409.

Yang, D. T. C., Wilson, B. J., and Harris, T. M. (1971). The structure of ipomeamaranol: A new toxic furanosesquiterpene from moldy sweet potato. *Phytochemistry* 10, 1653-1654.

Zieslin, N., Shaul, O., and Elad, Y. (1996). Suppression of Botrytis Blight in rose flowers with gibberelic acid. Possible formation of endogenous inhibitory compounds. *Journal of Plant Physiology* 149, 580-584.

樋浦誠 (1943). 甘藷の貯蔵並びに腐敗に関する研究 (第2報) 岐阜高等農林学術報告 50, 5-20.

獅山慈孝監修, 古沢巖他 (1989). 植物病理学実験マニュアル (東京: 養賢堂) .

山田哲治, 島本功, 渡辺雄一郎 (1997). 分子レベルから見た植物の耐病性 (東京: 秀潤社) .

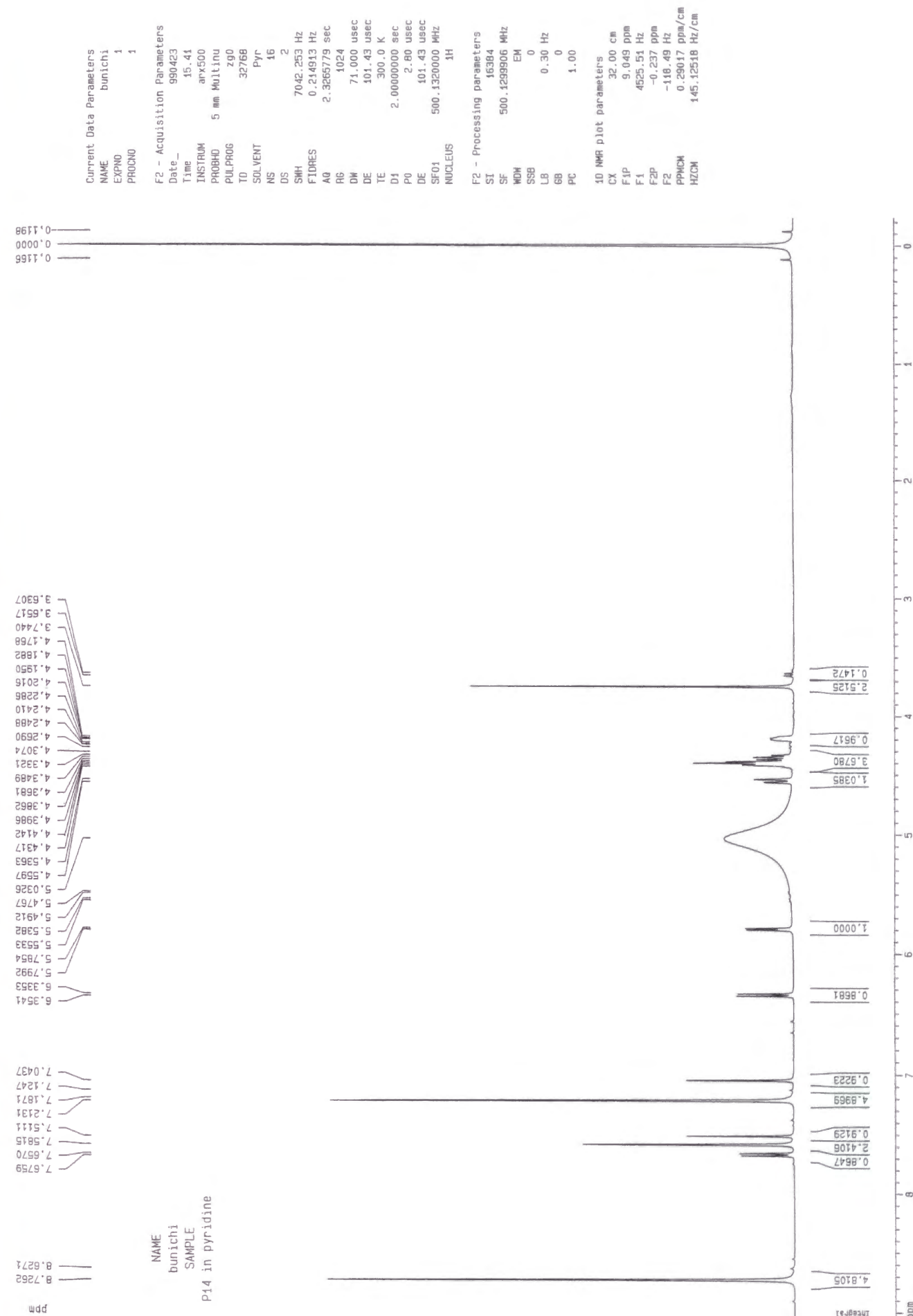
渡辺恒雄 (1998). 植物土壌病害の事典 (東京: 朝倉書店) .



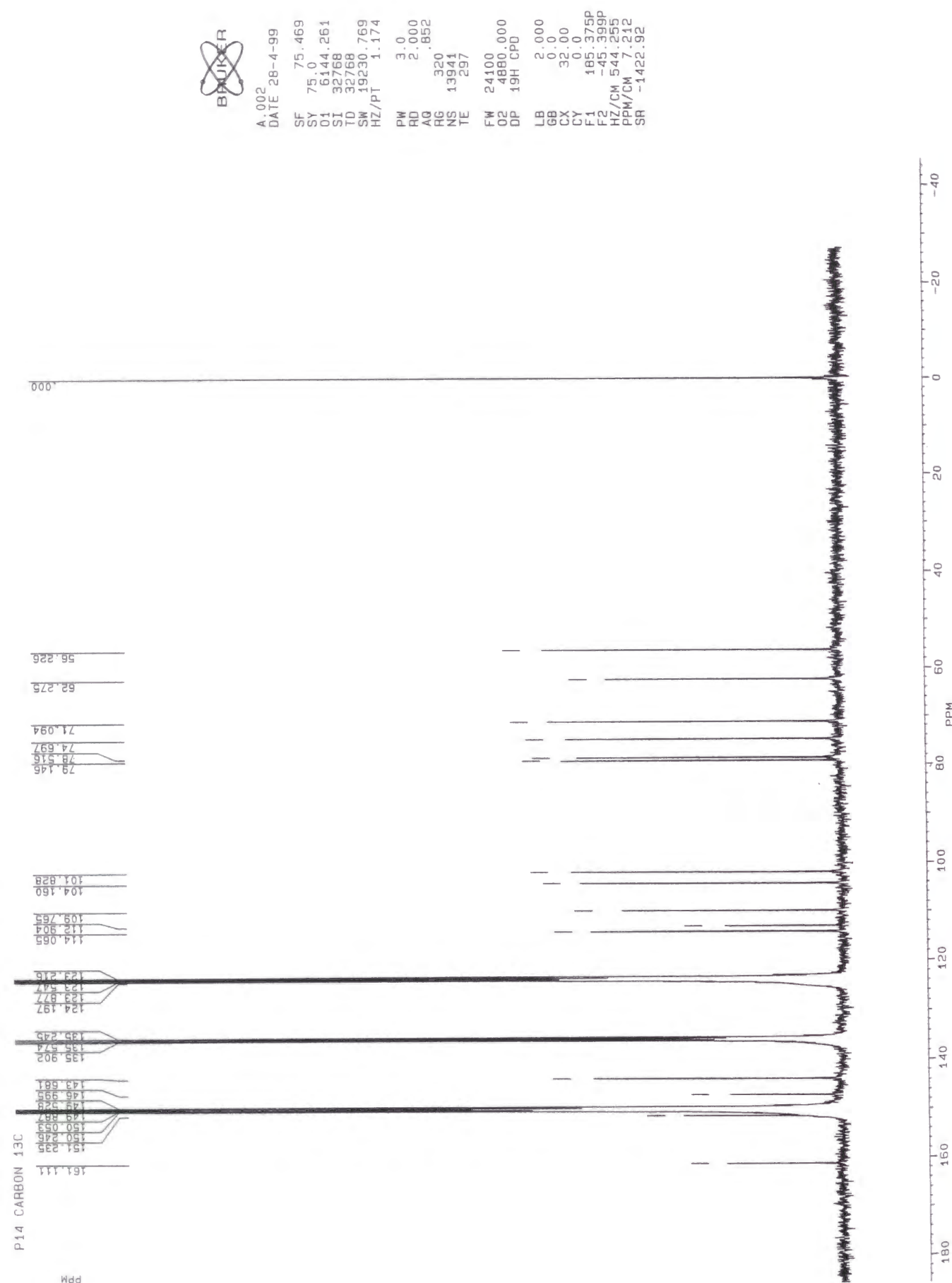
# 付録

以下に構造決定に際して測定したスペクトルをまとめた。  
(かっこ内は測定溶媒)

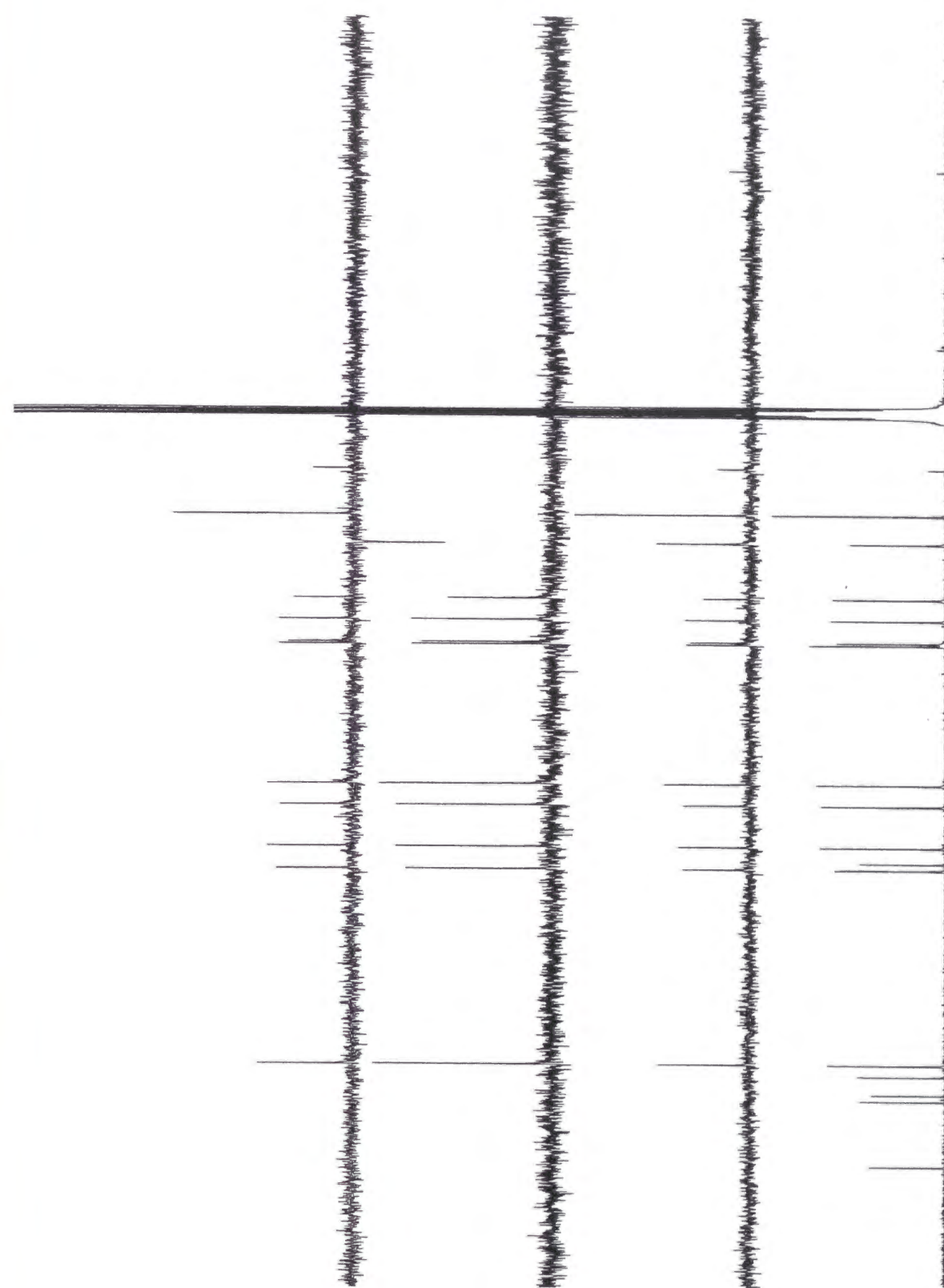
- 付録 1 成分 4-A (scopolin) の  $^1\text{H}$ -NMR スペクトル (pyridine- $d_5$ )
- 付録 2 成分 4-A (scopolin) の  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトル (pyridine- $d_5$ )
- 付録 3 成分 4-A (scopolin) の DEPT スペクトル (methanol- $d_4$ )
- 付録 4 成分 4-A (scopolin) の H-H COSY スペクトル (pyridine- $d_5$ )
- 付録 5 成分 4-A (scopolin) の HMQC スペクトル (pyridine- $d_5$ )
- 付録 6 成分 4-A (scopolin) の HMQC スペクトル  
・拡大 (3.6-4.7/48-83 ppm ; pyridine- $d_5$ )
- 付録 7 成分 4-A (scopolin) の HMBC スペクトル (pyridine- $d_5$ )
- 付録 8 成分 4-A (scopolin) アセチル化物の  $^1\text{H}$ -NMR スペクトル  
(chloroform- $d$ )
- 付録 9 成分 4-A (scopolin) 酸加水分解物後の  
極性画分  $^1\text{H}$ -NMR スペクトル (water- $d_2$ )
- 付録 10 成分 4-A (scopolin) 酸加水分解物後の  
極性画分  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトル (water- $d_2$ )
- 付録 11 成分 4-A (scopolin) 酸加水分解物後の低極性画分 (scopoletin)  
 $^1\text{H}$ -NMR スペクトル (methanol- $d_4$ )
- 付録 12 成分 5-B (fusalanipyrone) の  $^1\text{H}$ -NMR スペクトル (chloroform- $d$ )
- 付録 13 成分 5-B (fusalanipyrone) の  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトル (chloroform- $d$ )



付録 1 成分 4-A (scopolin) の  $^1\text{H}$ -NMR スペクトル (pyridine- $d_5$ )



付録2 成分4-A (scopolin) の  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトル (pyridine- $d_5$ )



付録3 成分4-A (scopolin) の DEPT スペクトル (methanol- $d_4$ )



Current Data Parameters

NAME shimizu  
EXPNO 2  
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters

Date\_ 980427  
Time 19.30  
INSTRUM arx500  
PROBHD 5 mm Multinu  
PULPROG zgpg30  
TD 4024  
SOLVENT Aceton  
NS 1  
DS 4  
SWH 4761.905 Hz  
FIDRES 4.650298 Hz  
AQ 0.1075700 sec  
RG 5700  
DM 105.000 usec  
DE 150.00 usec  
TE 300.0 K  
P16 2000.00 usec  
L21 100  
D1 1.00000000 sec  
P1 8.30 usec  
D0 0.0000030 sec  
D27 0.000100 sec  
D16 0.0002000 sec  
P0 8.30 usec  
D13 0.000040 sec  
DE 150.00 usec  
SF01 500.132000 MHz  
NUCLEUS 1H  
IND 0.00021200 sec

F1 - Acquisition Parameters

NO0 1  
TD 256  
SF01 500.132 MHz  
FIDRES 18.425762 Hz  
SM 9.432 ppm

F2 - Processing Parameters

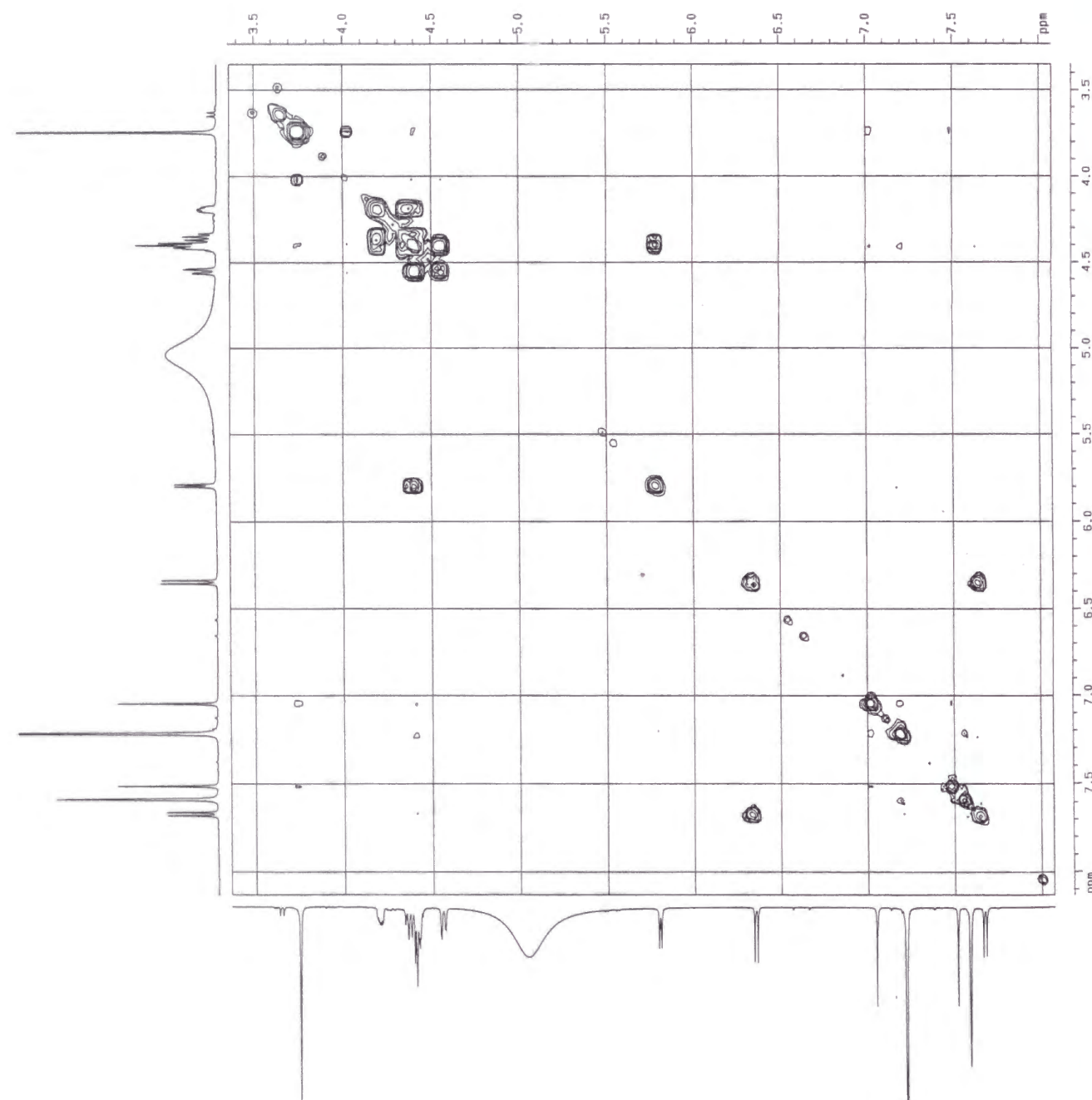
SI 512  
SF 500.1299897 MHz  
WDW 0  
SSB 0  
LB 0.00 Hz  
GB 0  
PC 1.00

F1 - Processing Parameters

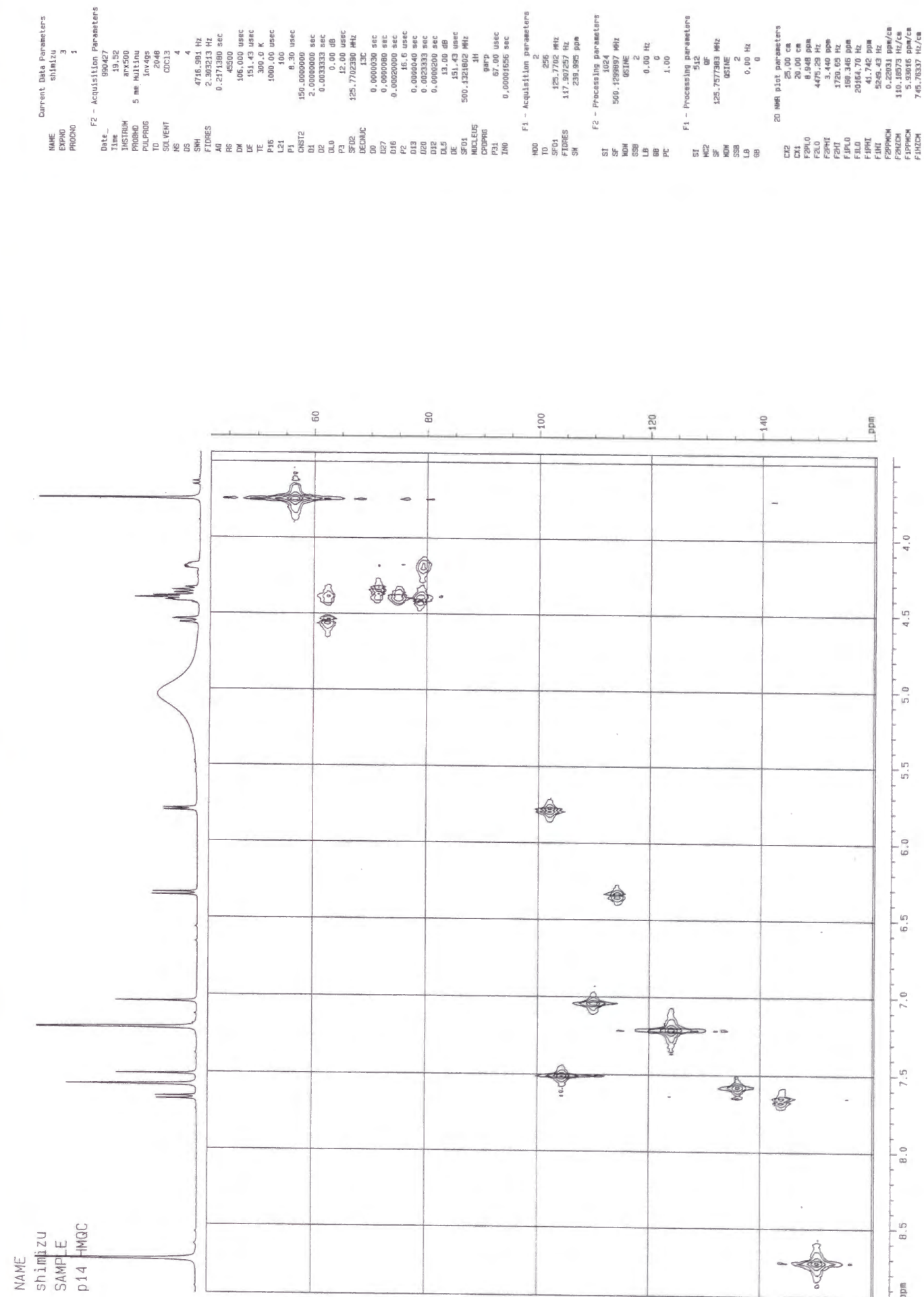
SI 512  
SF 500.1299897 MHz  
WDW 0  
SSB 0  
LB 0.00 Hz  
GB 0

2D NMR plot parameters

CX2 20.00 cm  
CX1 20.00 cm  
F2PL0 8.129 ppm  
F2L0 4065.72 Hz  
F2PHI 3.350 ppm  
F2HI 1675.47 Hz  
F1PL0 8.072 ppm  
F1L0 4037.12 Hz  
F1PHI 3.356 ppm  
F1HI 1678.63 Hz  
F2PPHOM 0.23886 ppm/cm  
F2HZOM 119.51265 Hz/cm  
F1PPHOM 0.23579 ppm/cm  
F1HZOM 117.92487 Hz/cm

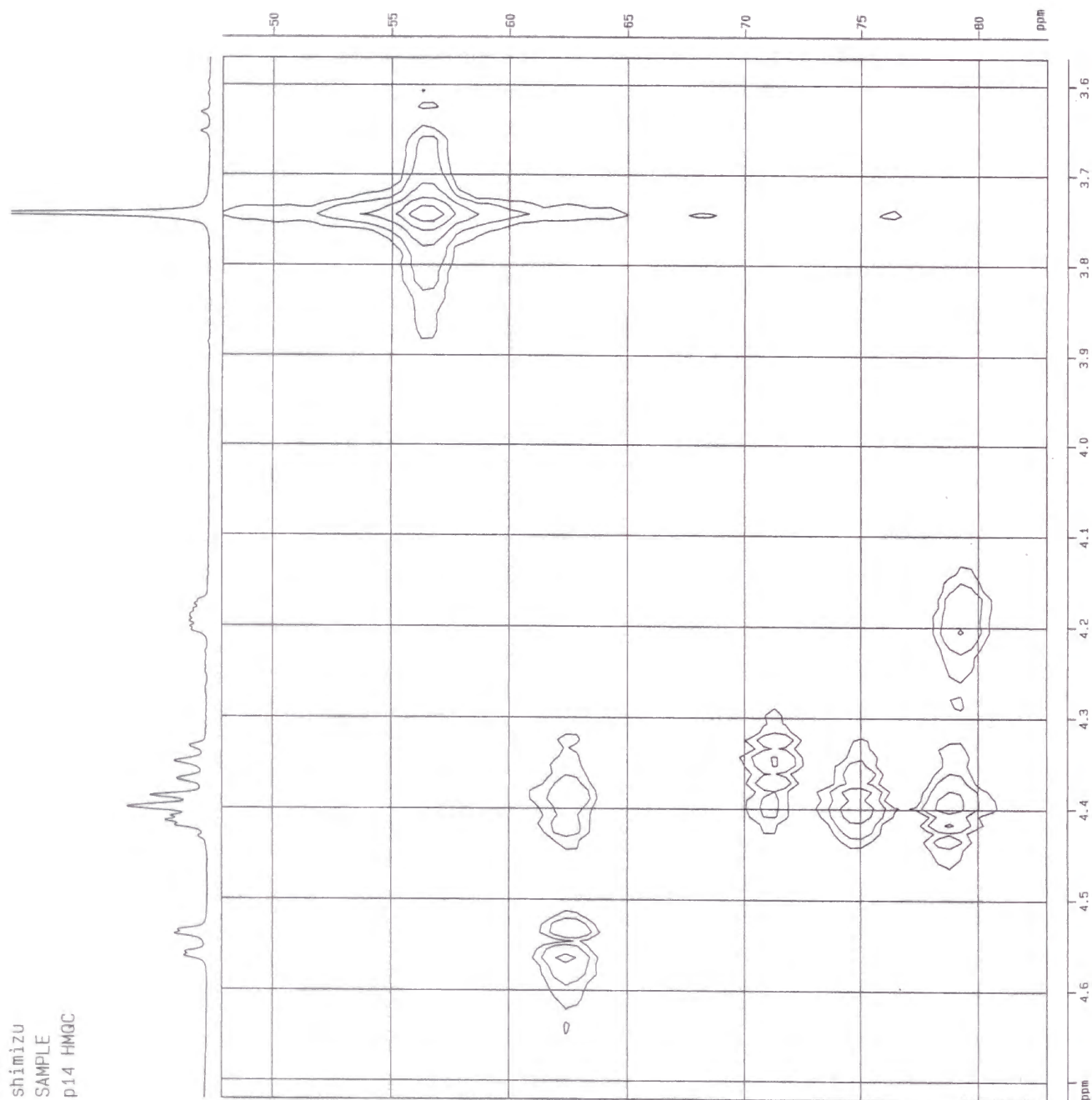


付録4 成分 4-A (scopolin) の H-H COSY スペクトル (pyridine- $d_5$ )



付録5 成分 4-A (scopolin) の HMQC スペクトル (pyridine- $d_5$ )

NAME  
shimizu  
SAMPLE  
p14 HMBC

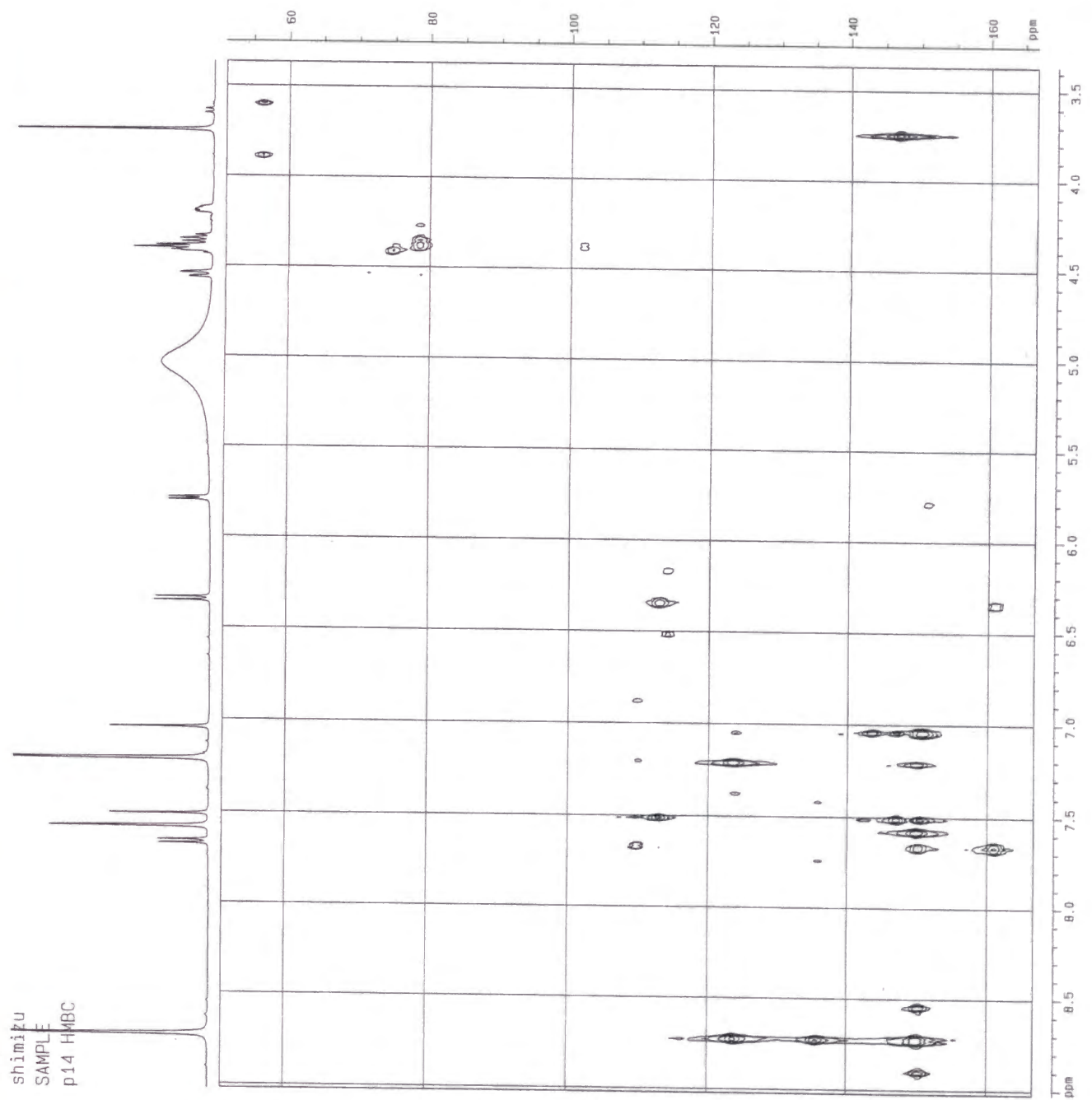


付録6 成分 4-A (scopolin) の HMQC スペクトル  
・拡大 (3.6-4.7/48-83 ppm ; pyridine- $d_5$ )

Current Data Parameters  
NAME shimizu  
EXPNO 4  
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters  
Date\_ 990427  
Time 19.52  
INSTRUM arx500  
PROBHD 5 mm Mx110  
PULPROG zgpg30  
TD 2048  
SOLVENT DMSO  
NS 4  
DS 4  
SWH 4716.981 Hz  
FIDRES 0.211360 Hz  
AQ 0.211360 sec  
RG 65500  
DM 105.000 usec  
DE 151.43 usec  
TE 300.0 K  
P1 1000.00 usec  
P2 100  
PC 0.30 usec  
DENS12 150.0000000  
D1 2.0000000 sec  
D2 0.0033333 sec  
D3 0.0033333 sec  
D4 0.0033333 sec  
D5 0.0033333 sec  
D6 0.0033333 sec  
D7 0.0033333 sec  
D8 0.0033333 sec  
D9 0.0033333 sec  
D10 0.0033333 sec  
D11 0.0033333 sec  
D12 0.0033333 sec  
D13 0.0033333 sec  
D14 0.0033333 sec  
D15 0.0033333 sec  
D16 0.0033333 sec  
D17 0.0033333 sec  
D18 0.0033333 sec  
D19 0.0033333 sec  
D20 0.0033333 sec  
D21 0.0033333 sec  
D22 0.0033333 sec  
D23 0.0033333 sec  
D24 0.0033333 sec  
D25 0.0033333 sec  
D26 0.0033333 sec  
D27 0.0033333 sec  
D28 0.0033333 sec  
D29 0.0033333 sec  
D30 0.0033333 sec  
D31 0.0033333 sec  
D32 0.0033333 sec  
D33 0.0033333 sec  
D34 0.0033333 sec  
D35 0.0033333 sec  
D36 0.0033333 sec  
D37 0.0033333 sec  
D38 0.0033333 sec  
D39 0.0033333 sec  
D40 0.0033333 sec  
D41 0.0033333 sec  
D42 0.0033333 sec  
D43 0.0033333 sec  
D44 0.0033333 sec  
D45 0.0033333 sec  
D46 0.0033333 sec  
D47 0.0033333 sec  
D48 0.0033333 sec  
D49 0.0033333 sec  
D50 0.0033333 sec  
D51 0.0033333 sec  
D52 0.0033333 sec  
D53 0.0033333 sec  
D54 0.0033333 sec  
D55 0.0033333 sec  
D56 0.0033333 sec  
D57 0.0033333 sec  
D58 0.0033333 sec  
D59 0.0033333 sec  
D60 0.0033333 sec  
D61 0.0033333 sec  
D62 0.0033333 sec  
D63 0.0033333 sec  
D64 0.0033333 sec  
D65 0.0033333 sec  
D66 0.0033333 sec  
D67 0.0033333 sec  
D68 0.0033333 sec  
D69 0.0033333 sec  
D70 0.0033333 sec  
D71 0.0033333 sec  
D72 0.0033333 sec  
D73 0.0033333 sec  
D74 0.0033333 sec  
D75 0.0033333 sec  
D76 0.0033333 sec  
D77 0.0033333 sec  
D78 0.0033333 sec  
D79 0.0033333 sec  
D80 0.0033333 sec  
D81 0.0033333 sec  
D82 0.0033333 sec  
D83 0.0033333 sec  
D84 0.0033333 sec  
D85 0.0033333 sec  
D86 0.0033333 sec  
D87 0.0033333 sec  
D88 0.0033333 sec  
D89 0.0033333 sec  
D90 0.0033333 sec  
D91 0.0033333 sec  
D92 0.0033333 sec  
D93 0.0033333 sec  
D94 0.0033333 sec  
D95 0.0033333 sec  
D96 0.0033333 sec  
D97 0.0033333 sec  
D98 0.0033333 sec  
D99 0.0033333 sec  
D100 0.0033333 sec

NAME  
shimizu  
SAMPLE  
p14 HMBC



付録7 成分 4-A (scopolin) の HMBC スペクトル (pyridine- $d_5$ )

Current Data Parameters  
NAME shimizu  
EXPNO 4  
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters  
Date\_ 990427  
Time 19.52  
INSTRUM arx500  
PROBHD 5 mm Mx110  
PULPROG zgpg30  
TD 2048  
SOLVENT DMSO  
NS 4  
DS 4  
SWH 4716.981 Hz  
FIDRES 0.211360 Hz  
AQ 0.211360 sec  
RG 65500  
DM 105.000 usec  
DE 151.43 usec  
TE 300.0 K  
P1 1000.00 usec  
P2 100  
PC 0.30 usec  
DENS12 150.0000000  
D1 2.0000000 sec  
D2 0.0033333 sec  
D3 0.0033333 sec  
D4 0.0033333 sec  
D5 0.0033333 sec  
D6 0.0033333 sec  
D7 0.0033333 sec  
D8 0.0033333 sec  
D9 0.0033333 sec  
D10 0.0033333 sec  
D11 0.0033333 sec  
D12 0.0033333 sec  
D13 0.0033333 sec  
D14 0.0033333 sec  
D15 0.0033333 sec  
D16 0.0033333 sec  
D17 0.0033333 sec  
D18 0.0033333 sec  
D19 0.0033333 sec  
D20 0.0033333 sec  
D21 0.0033333 sec  
D22 0.0033333 sec  
D23 0.0033333 sec  
D24 0.0033333 sec  
D25 0.0033333 sec  
D26 0.0033333 sec  
D27 0.0033333 sec  
D28 0.0033333 sec  
D29 0.0033333 sec  
D30 0.0033333 sec  
D31 0.0033333 sec  
D32 0.0033333 sec  
D33 0.0033333 sec  
D34 0.0033333 sec  
D35 0.0033333 sec  
D36 0.0033333 sec  
D37 0.0033333 sec  
D38 0.0033333 sec  
D39 0.0033333 sec  
D40 0.0033333 sec  
D41 0.0033333 sec  
D42 0.0033333 sec  
D43 0.0033333 sec  
D44 0.0033333 sec  
D45 0.0033333 sec  
D46 0.0033333 sec  
D47 0.0033333 sec  
D48 0.0033333 sec  
D49 0.0033333 sec  
D50 0.0033333 sec  
D51 0.0033333 sec  
D52 0.0033333 sec  
D53 0.0033333 sec  
D54 0.0033333 sec  
D55 0.0033333 sec  
D56 0.0033333 sec  
D57 0.0033333 sec  
D58 0.0033333 sec  
D59 0.0033333 sec  
D60 0.0033333 sec  
D61 0.0033333 sec  
D62 0.0033333 sec  
D63 0.0033333 sec  
D64 0.0033333 sec  
D65 0.0033333 sec  
D66 0.0033333 sec  
D67 0.0033333 sec  
D68 0.0033333 sec  
D69 0.0033333 sec  
D70 0.0033333 sec  
D71 0.0033333 sec  
D72 0.0033333 sec  
D73 0.0033333 sec  
D74 0.0033333 sec  
D75 0.0033333 sec  
D76 0.0033333 sec  
D77 0.0033333 sec  
D78 0.0033333 sec  
D79 0.0033333 sec  
D80 0.0033333 sec  
D81 0.0033333 sec  
D82 0.0033333 sec  
D83 0.0033333 sec  
D84 0.0033333 sec  
D85 0.0033333 sec  
D86 0.0033333 sec  
D87 0.0033333 sec  
D88 0.0033333 sec  
D89 0.0033333 sec  
D90 0.0033333 sec  
D91 0.0033333 sec  
D92 0.0033333 sec  
D93 0.0033333 sec  
D94 0.0033333 sec  
D95 0.0033333 sec  
D96 0.0033333 sec  
D97 0.0033333 sec  
D98 0.0033333 sec  
D99 0.0033333 sec  
D100 0.0033333 sec





A.010
DATE 16-4-99
SF 300.133
SY 299.0
SI 4560.000
SD 32768
ST 32768
SW 5376.344
HZ/PT 328
PW 3.0
RD 2.000
RAQ 3.047
RGR 80
NRS 128
TE 297
FW 6800
OZ 7200.000
DP 63L P0
LB .300
GB 0.0
CX CX 32.00
F1 0.0
F2 9.801P
F3 .199P
HZ/CM 93.788
PPM/CM .312
SR 3366.20

付録 8 成分 4-A (scopolin) アセチル化物の  $^1\text{H}$ -NMR スペクトル  
(chloroform-*d*)

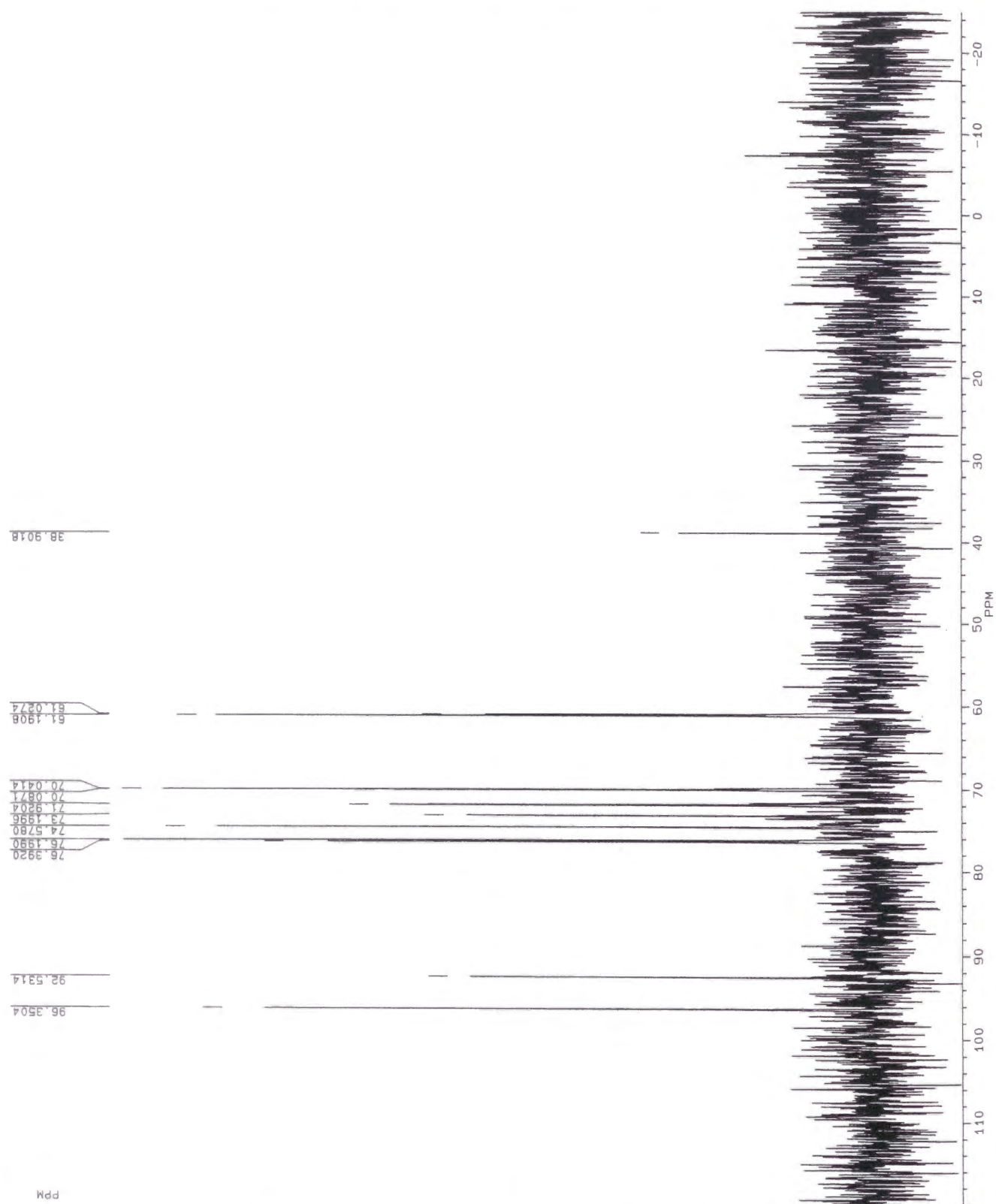


A.004	DATE	18-6-99
SY	300.134	
SF	299.0	
O1	5350.000	
SI	32768	
TD	32768	
ST	4201.681	
HZ/PT	.256	
PW	3.0	
RD	2.000	
AG	3.899	
RG	32	
NS	32	
TE	297	
FW	5300	
O2	7200.000	
DP	63L P0	
LB	.300	
GB	0.0	
CC	32.00	
CX	0.0	
F1	5.500P	
F2	2.500P	
FZ/CM	27.200	
PPM/CM	.091	
SR	4100.57	

付録9 成分 4-A (scopolin) 酸加水分解物後の  
極性画分  $^1\text{H-NMR}$  スペクトル (water- $d_2$ )



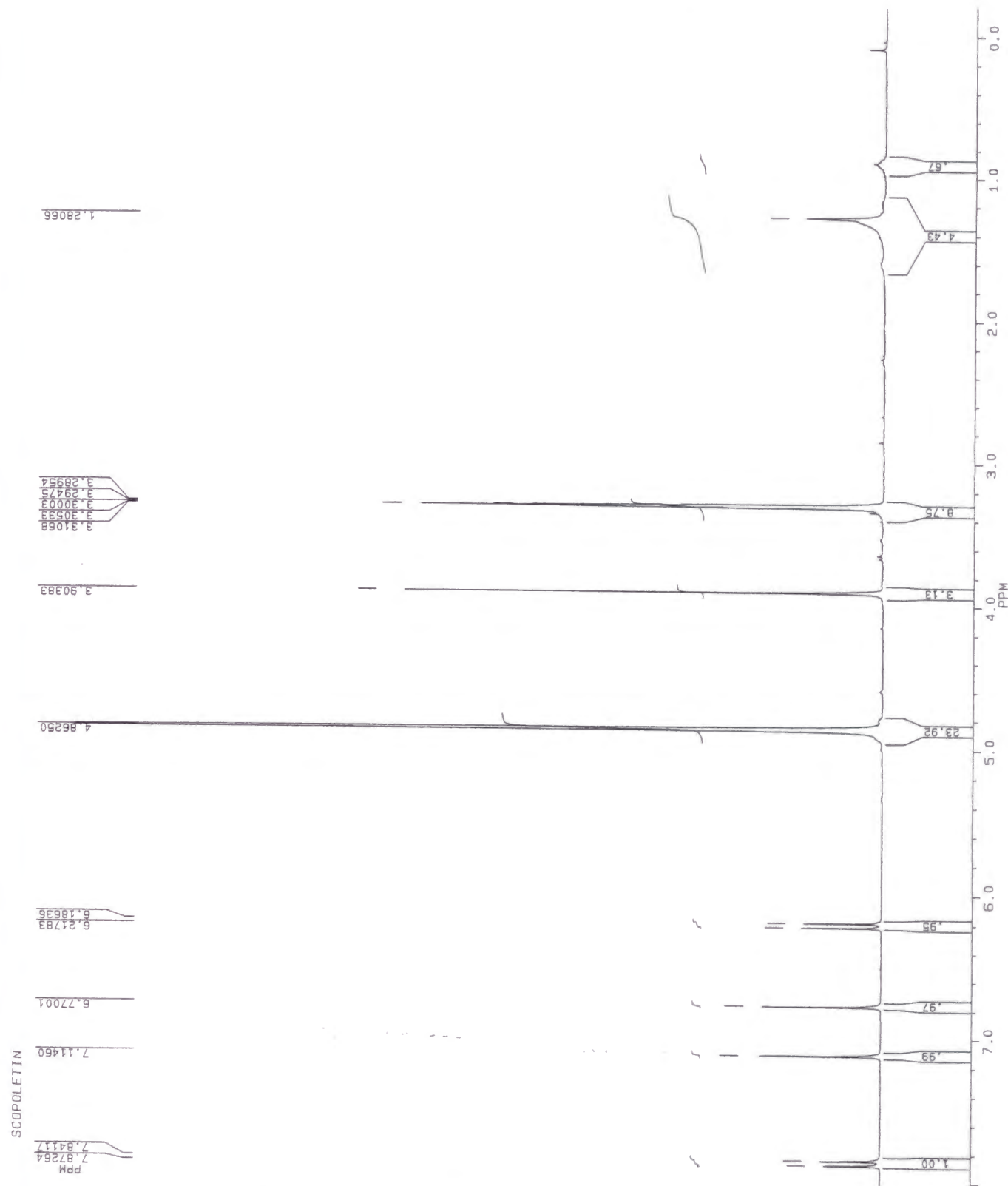
A.004  
DATE 18-6-99  
SF 75.469  
SY 75.0  
O1 6300.000  
SI 32768  
TD 32768  
SW 19230.769  
HZ/PT 1.174  
PW 3.0  
RD 2.000  
AG 320.852  
RG 320  
NS 14842  
TE 297  
FW 24100  
O2 5650.000  
DP 19H CPD  
LB 2.000  
GB 0.0  
CX 32.00  
CY 0.0  
F1 120.011P  
F2 -24.988P  
HZ/CM 341.966  
PPM/CM 4.531  
SR -1250.00



付録 1 0 成分 4-A (scopolin) 酸加水分解物後の  
極性画分  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトル (water- $d_2$ )



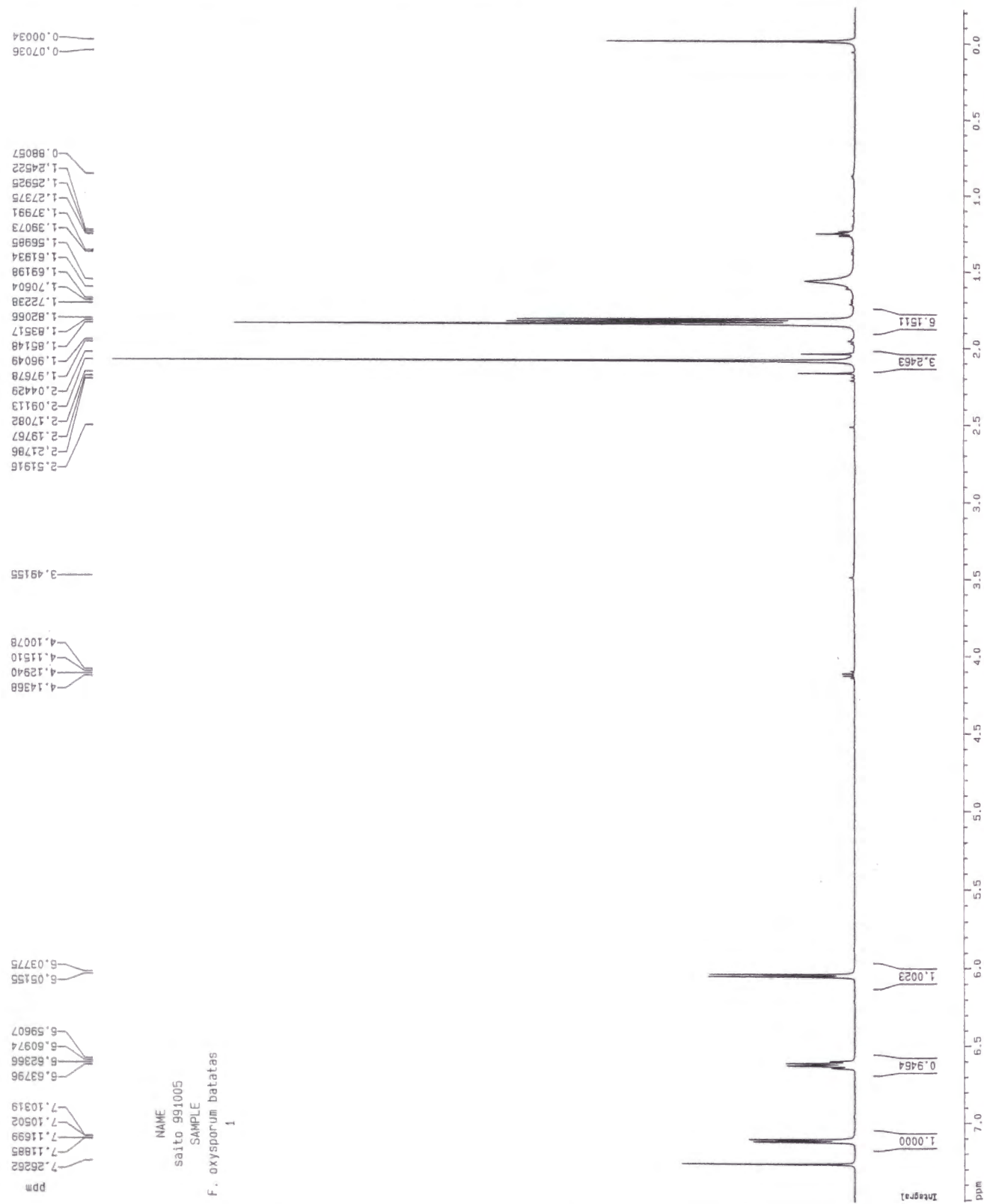
A.030  
DATE 12-5-99  
SF 300.135  
SY 299.0  
O1 5740.000  
SI 32768  
TD 32768  
SW 4201.681  
HZ/PT .256  
PW 3.0  
RD 2.000  
AG 160  
RG 160  
NS 256  
TE 297  
FW 5300  
O2 7200.000  
DP 63L P0  
LB .300  
GB 0.0  
CX 32.00  
CY 0.0  
F1 8.000P  
F2 -.199P  
HZ/CM 76.903  
PPM/CM .256  
SR 4551.83



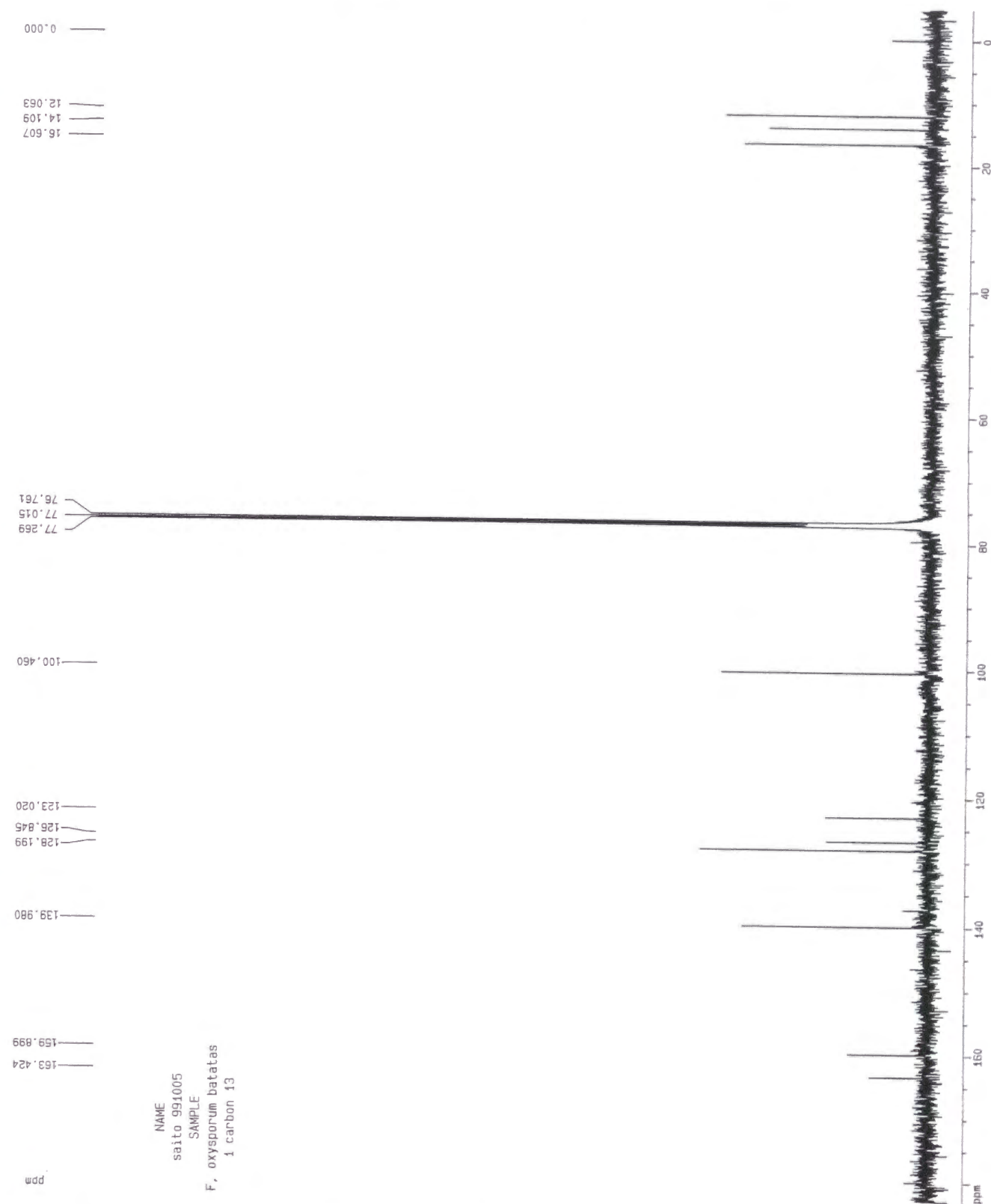
付録 1 1 成分 4-A (scopolin) 酸加水分解物後の低極性画分 (scopoletin)  
 $^1\text{H}$ -NMR スペクトル (methanol- $d_4$ )



付録 1 2 成分 5-B (fusalanipyrene) の <sup>1</sup>H-NMR スペクトル (chloroform-d)



付録 1 3 成分 5-B (fusalanipyrene) の <sup>13</sup>C-NMR スペクトル (chloroform-d)





謝辞

枝うちかはす梅と梅

私が京都大学農学部生物調節化学研究室を知ったのは学部3回生のときでした。父が仕事上のつき合いで京都大学農学部の教授と知り合いになっており、その先生が私の属している農芸化学におられると言うことを思い出したのがきっかけであります。思えば大学受験浪人時代、京都大学農学部農芸化学科を志望したのもその先生の「なんでもできるから来なさい」という言葉があったからだったと記憶しています。この何やらただならぬ「縁」を感じずにはいられない先生こそ、上野民夫教授であります。私は修士・博士過程あわせて5年間、植物と菌の相互作用の生物有機化学に関わりましたが、このような環境とテーマ、そして「京都」を与えてくださいました上野民夫博士（京都大学大学院農学研究科・教授）に感謝いたします。

私が4回生の時のソフトボール、曇天の下、京都大学農学部農薬研究施設との試合で私は打てませんでした。その時の相手のピッチャーが宮川恒博士でした。その年度の終わり、関西・淡路大震災、地下鉄サリン事件と大事件の後、東京の農薬学会で私は卒業論文研究の内容をまとめて発表をしました。その時、会場の後ろの方に博士がおられたのを覚えております。その後先生は生物調節化学研究室に助教授としてこられ、ソフトボールも同じチームですることになりました。そのソフトボールの試合で私が大エラーをした後、「清水はもっと冷静なヤツやと思った」といわれたのを覚えております。化けの皮がはがれた後の、私に対して、実験方法や方針、実験に関する議論、そして論文校正、さらには研究以外の事柄に関して、多大なご助力を頂きました宮川恒博士（京都大学大学院農学研究科・助教授）に感謝いたします。宮川博士は5年間を通して、まさに燈台でありました。

修士、博士論文のテーマの原点である非病原性フザリウムを用いたサツマイモつる割れ病の防除法を確立され、これについて私が研究することを快諾していただき、便宜を図ってくださいました小川奎博士（九州農業試験場）に感謝いたします。

1998年の夏は雨のよく降る、それでいてあつい夏でした。サツマイモ苗が大量に必要となり、茨城県農業総合センターに場所を借り実験を行うことになりました。この時、現地でサツマイモの苗、各種培養菌体、および実験スペースを提供していただき、かつ様々な便宜を図っていただいた、茨城県総合農業センター渡辺健博士に感謝いたします。さらに渡辺博士には京都で栽培するためのサツマイモ苗、実験に用いたNPFおよびPFの菌体とPCNB剤の提供にとどまらず、実験全般に関する有益なアドバイスも頂きました。重ねて御礼申し上げます。また実験の合間を縫って聞かせていただく圃場実験のお話や、広い農場の風景、夏のスイカ、温室の暑さ、そして水戸駅前の「かにや」の味とにおいはいまでも忘れられません。

研究室に配属されてから6年間、様々な御指導頂きました中川好秋博士（京都大学大学院農学研究科・助手）に感謝いたします。中川博士には卒業論文研究を指導していただきました。また博士から研究室生活を通して「研究とは何か」ということ、そして「研究者とはいかにあるべきか」を学びました。そして、何度も熱い助言を頂きました。中川博士とは対照的に、常に冷静で詳細な助言を頂きました。

赤松美紀博士（京都大学大学院農学研究科・助教授）に感謝いたします。私は赤松博士にも常に真理を探究する「研究者」を学んだと考えております。

林治煥博士（現・韓国忠南大学校・助教授）には真菌の培養法や天然物の取り扱いに関して様々な御指導賜りました。また井上雅文博士（現・大日本除虫菊株式会社）、山中寿城先輩（現・宝酒造）には抗菌活性検定法や天然物取り扱いなどの指導をしていただきました。3氏に頂いた御指導がいまの私の基礎であると感じ、ここに厚く御礼申し上げます。また化合物の分子量の測定にあたり測定法に関する御指導と、大気圧イオン化法質量分析計の使用を快諾してくださいました石原亨氏（京都大学助手）に感謝します。

私の研究生生活の手本としていつも念頭にあったのが山口博志先輩（現・日本農薬株式会社）、岡澤敦司先輩（現・大阪大学助手）、宮下正弘先輩（現・カルフォルニア大学ディビス校研究員）、岡田雅和先輩（現・宇部興産）、伊藤浩彰先輩（現・三共株式会社）です。先輩方には実験に関するささいな質問にも丁寧に指導していただきましたことに感謝いたします。また白武亮太郎君（現・大日本製薬）、吉田圭君（現・三井化学）、山下昌宏君（現・ライオン）諸氏には入学以来ともに研鑽しあい、また心のおけぬ友としてお互いに研究できたことを光栄に感じます。長い研究室生活をともに過ごした西脇寿君、そして服部一成君（現・ファイザー製薬）、中森朋子嬢（現・ユニチカ環境技術センター）、二橋陽一郎君（現・日本オルガノン）には公私に渡ってご助力頂きましたことに感謝いたします。

私が修士2回生の春、丸い眼鏡をかけたうら若き4回生が研究室に来ました。彼は私の共同研究者としてipomeamaroneを合成するテーマを選んでいました。第一声の「お願いします！」に、彼の有機化学にかける熱意を感じつつ、私は詳しく合成を教えることができない自分に不甲斐なさを感じたものです。にもかかわらず、卒業論文研究を通してipomeamarone標品を合成し十分量を供給してくれた彼に、感謝いたします。いまでは生物調節化学の合成を背負ってたつ重鎮にまで成長した彼は植村一平君であります。ともに研究生生活を通して磨き合えたこと、光栄であります。また彼とともに研究室に配属された松田史生君にはすさまじいまでの実験へのこだわりと人間らしさを見せていただきました。また天野拓雄君とは腐れ縁を、村井孝弘君には熱い助言をいただきました。ありがとうございました。これも同じく4月。次の年、私が博士1回生のとき、研究室に二人の女学生が鳴り物入りで配属されてきました。そのうちの一人、藤森明日香嬢には植物の抵抗反応活性化剤の合成と、これらの十分量の提供に感謝いたします。鳴り物入りのもう一人、浦上真知子嬢、そして水口智江可嬢には日常の研究室生活で御世話になりました。ありがとうございました。また渡辺文太君には実験の合間の気晴らしを始め、公私に渡って御世話になりました。彼の存在は僕にとって、スメタナ作曲「我が祖国・モルダウ」を聴いているようでありました。そして、博士課程最後の共同研究者は馬力のある人でした。その人、斉藤福子嬢はPF培養物からの植物毒素の抽出、そしてそれらの活性について興味深いデータを提供してくださいました。ありがとうございました。また山田憲君、米本哲郎君、九沢征樹君（現・マルハ）、そして石井正輝君、



森茂太郎君，森安右知子嬢，橋本隆秀君，阿野理恵子嬢，佐藤一行君，岸川英敏君，高橋かおる嬢，新山雅人君には公私に渡って御世話になりましたこと，共に研究室生活を送れたことに感謝いたします．そして，研究室の試薬や器具の購入にはじまり，その他研究室生活全般に渡って様々な便宜を図ってくださり，まさに縁の下の力持ちとして研究生活を支えてくださいました宮下佐和子嬢と半井里佳嬢に厚く御礼申し上げます．

最後に，病床からも常に私を叱咤激励し続け，昨年，相前後して他界した鎌倉の祖母・文子，伯母・暢子に本研究を捧げます．